



TITLE:

シロイヌナズナにおいて頂端分裂
組織の構造と機能の維持に関わる
FASCIATA遺伝子の同定と機能解析(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

賀屋, 秀隆

CITATION:

賀屋, 秀隆. シロイヌナズナにおいて頂端分裂組織の構造と機能の維持
に関わるFASCIATA遺伝子の同定と機能解析. 京都大学, 2001, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2001-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3183042>

RIGHT:

学位申請論文

シロイヌナズナにおいて
頂端分裂組織の構造と機能の維持に関わる
*FASCIATA*遺伝子の同定と機能解析

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻植物学系

賀屋 秀隆

目次

要 旨 1
序 論 3
方 法	
1) 材料と生育条件10
2) <i>hosoba toge toge (hot)</i> の単離10
3) <i>fasciata (fas)</i> 突然変異体の単離10
4) シロイヌナズナからのゲノムDNA調製	
(a) 少量調製 (PCRの鋳型などに使用)11
(b) 大量調製 (ゲノムライブラリーの作製・ サザンゲルプロットなどに使用)11
5) ゲノム libraryの作製11
6) TAIL-PCR法によるLB-植物ゲノム領域の回収11
7) DNAゲルプロット解析12
8) 植物組織あるいは培養細胞からの全RNAおよびpoly(A) ⁺ RNAの調製12
9) RT-PCR13
10) RT-PCRを用いた組織別 <i>FAS1</i> , <i>FAS2</i> 遺伝子の発現解析13
11) RNA ゲルプロット解析13
12) <i>FAS1</i> , <i>FAS2</i> , <i>AtMSI1</i> 蛋白質の発現14
13) <i>FAS1/FAS2/AtMSI1</i> 複合体形成能とDNA複製依存的 ヌクレオソームの形成能の解析15
14) 成熟胚の形態観察15
15) テクノビット樹脂切片の作製と観察15
16) 根の伸長速度の測定16
17) デンプン顆粒染色16

18) 共焦点レーザー顕微鏡によるRAMの観察16
19) <i>FAS1</i> , <i>FAS2</i> 遺伝子のプロモーター/ β -Glucuronidase(GUS)の構築17
20) 形質転換シロイヌナズナの作製17
21) GUS染色18
22) <i>in situ</i> RNAハイブリダイゼーション18
23) シロイヌナズナ培養細胞の植え継ぎと増殖刺激後の発現解析20
24) 形質転換タバコ培養細胞BY-2の作製とタバコ培養細胞BY-2の細胞周期同調化後の発現解析21
結 果	
1) <i>FAS1</i> 遺伝子の機能欠損変異体である <i>hot</i> 突然変異体	
(a) <i>hot</i> 突然変異体の単離と表現型22
(b) <i>hot</i> 突然変異体は <i>FAS1</i> 遺伝子と <i>FT</i> 遺伝子の両方の機能に欠失を持つ23
2) 花茎帯化表現型を示す <i>fas</i> 突然変異体の遺伝解析24
3) 成熟胚における <i>fas</i> 突然変異体の表現型24
4) SAMにおける <i>fas</i> 突然変異体の表現型25
5) RAMにおける <i>fas</i> 突然変異体の表現型26
6) <i>fas1</i> ; <i>fas2</i> 二重突然変異体の表現型28
7) <i>FAS1</i> 遺伝子の同定	
(a) <i>hot</i> 突然変異体のT-DNA挿入部位の構造28
(b) <i>FAS1</i> 遺伝子の同定と遺伝子構造30
(c) 予想されるFAS1蛋白質とCAF-1 p150とのホモロジー31
8) <i>FAS2</i> 遺伝子の同定32
9) <i>FAS1</i> , <i>FAS2</i> 遺伝子のコピー数34
10) FAS1, FAS2, AtMSI1蛋白質によるFAS複合体形成とCAF-1活性34
11) <i>fas</i> 突然変異体の頂端分裂組織における遺伝子の発現の解析36
12) <i>FAS1</i> , <i>FAS2</i> 遺伝子の発現解析	
(a) RT-PCRによる組織別発現解析38
(b) <i>in situ</i> RNAハイブリダイゼーションによる発現解析38

(c) <i>FAS</i> 遺伝子のプロモーター近傍にあるシスエレメント39
(d) プロモーターGUS融合遺伝子による発現解析41
(e) <i>FAS</i> 遺伝子の発現と分裂活性および細胞周期41
考 察	
1) <i>hot</i> 突然変異体の表現型における <i>FAS1</i> , <i>FT</i> 遺伝子の欠損の寄与43
2) T-DNA挿入に伴う広範囲のゲノム欠失43
3) <i>FAS</i> 遺伝子は胚の形態形成には必須でない43
4) <i>FAS</i> 遺伝子はSAMとRAMの構造と機能の維持に必要である44
5) FAS1, FAS2, AtMSI1蛋白質の機能45
6) <i>fas</i> 突然変異体での <i>WUS</i> 遺伝子・ <i>SCR</i> 遺伝子の発現制御45
7) 後胚発生での形態形成とCAF-1の機能46
8) CAF-1機能欠損による多細胞生物での影響47
9) <i>fas</i> 突然変異体の解析から推測できるCAF-1の機能48
10) 今後の課題と展望	
(a) <i>in situ</i> RNAハイブリダイゼーションによる <i>FAS1</i> , <i>FAS2</i> 遺伝子の発現解析49
(b) 胚での <i>WUS</i> 遺伝子の発現解析50
(c) <i>in situ</i> RNAハイブリダイゼーションによる <i>CLV3</i> 遺伝子の発現解析50
(d) <i>SHR</i> 遺伝子の発現解析50
(e) 長期課題51
謝 辞	
引用文献53

要 旨

高等植物の茎頂分裂組織 (shoot apical meristem, SAM) と根端分裂組織 (root apical meristem, RAM) は植物体軸の両極にあり、後胚発生過程の形態形成において中心的な役割を担う。これまでの組織学的な解析等から、後胚発生過程を通してSAMとRAMの構造の機能は維持されていることが明らかにされている。しかし、その維持メカニズムについては不明である。本研究では、分子生物学的アプローチからこの維持メカニズムを解明することを目的にして、SAMとRAMの両方に異常を示すシロイヌナズナの突然変異体の単離とその原因遺伝子の同定および機能解析をおこなった。

シロイヌナズナのT-DNAタグラインから*hosoba toge toge* (*hot*; 細葉棘々) 突然変異体を得た。この突然変異体は本葉の細化、花茎の帯化、根の伸長遅延などの表現型を示す。この表現型は、SAMとRAMの構造と機能の維持に異常があることを示唆するものと考えた。対立性検定の結果、*hot*突然変異体は*FAS1*遺伝子に欠損があることが判明した。SAMとRAMの表現型異常は*FAS1*遺伝子の機能欠損によるものであると推測し、*FASCIATA* (*FAS*) 遺伝子の機能解析をおこなった。

*FAS*遺伝子には、似た表現型異常を示す突然変異体として*FAS1*、*FAS2*の2つの遺伝子座が報告されている。しかし、詳細な表現型解析、遺伝子の同定とその機能解析はおこなわれていなかった。そこで、胚発生後のSAMとRAMに着目して*fas*突然変異体の詳細な表現型解析をおこなった。その結果、*fas*突然変異体ではSAMとRAMの両方において構造と機能の維持に異常があることを明らかにした。また、*fas1*、*fas2*それぞれ単独の突然変異体と*fas1;fas2*二重突然変異体の表現型がよく似ていることから、*FAS1*、*FAS2*遺伝子は同一経路で働いている可能性が示唆された。このように、非常に興味深い表現型異常を示したので、これら*fas*遺伝子の同定を試みた。*fas1*遺伝子の同定には、T-DNAタグライン由来の*hot*突然変異体を用いた。まず、ゲノム解析の結果よりT-DNAの挿入に伴い、第一染色体下腕の75.8kbp領域が欠失していることを明らかにした。この欠失領域には、*FAS*遺伝子を含む15個の遺伝子が予測されていたが、*fas1-1*、*fas1-2*突然変異体における塩基置

換の有無をもとに、*FAS1*遺伝子の同定した。*FAS1*遺伝子はヒトchromatin assembly factor-1 (CAF-1) のp150サブユニットと高いホモロジーをもつ蛋白質をコードしていた。ヒトCAF-1は3つのサブユニット (p150, p60, p48) の複合体で、DNA複製に依存したヌクレオソームアセンブリーに関わる蛋白質として単離されたものである。二重突然変異体の表現型から*FAS1*遺伝子と*FAS2*遺伝子は同一経路上で機能している可能性が示唆されたことから、*FAS2*遺伝子はCAF-1の別のサブユニットをコードする遺伝子である可能性が高いと推測し、*FAS2*遺伝子の同定を試みた。その結果、*FAS2*遺伝子のコードする蛋白質は*FAS1*遺伝子と同じくヒトCAF-1のp60サブユニットとホモロジーを持つことが明らかになった。

FAS1、*FAS2*蛋白質の機能について生化学的解析をおこない、*in vitro*において両蛋白質と3つ目の蛋白質AtMSI1は複合体を形成し、ヌクレオソームアセンブリー活性を持つことを示した。この結果はFAS複合体 (*FAS1/FAS2/AtMSI1*) がシロイヌナズナにおけるCAF-1のカウンターパートとして機能することを示唆している。次に、*fas*突然変異体でのSAMとRAMの異常の原因を推測するために、これまでにSAMあるいはRAMにおいてその構造や機能に関わる遺伝子で、解析の進んでいる*WUSCHEL* (*WUS*) 遺伝子、*SCARECROW* (*SCR*) 遺伝子の発現パターンを調べた。その結果、異所的な発現と消失が起きていることを観察した。

出芽酵母における解析より、CAF-1の機能欠損変異体は細胞増殖をとおして遺伝子発現の抑制状態の維持できないことから、CAF-1はDNA複製の前後で遺伝子の発現状態を安定的に維持するメカニズムに寄与する可能性が示唆されている。そのメカニズムの一つの候補としてエピジェネティック情報の維持が考えられている。これらのことを踏まえ、本研究結果から次のような仮説を提唱した。*FAS*遺伝子は、シロイヌナズナのCAF-1としてヌクレオソームの形成を通してエピジェネティック情報の維持メカニズムに関わり、さらに、それにより遺伝子の発現制御に関与することで、SAMとRAMの構造と機能を維持しているだろう。

序 論

高等植物の形態形成が高等動物と大きく異なる点の一つは、それが生活環を通しておこなわれることである。胚発生期には植物体の基本的な体制(子葉, 胚軸, 幼根)が形成されると同時に, 体軸の両極に少数の幹細胞を含む茎頂分裂組織 (shoot apical meristem, SAM)と根端分裂組織 (root apical meristem, RAM)が形成される。後胚発生期にはこのSAMとRAMが外界の環境に適応しながら植物体を特徴づけるほとんどの器官(茎, 葉, 花, 根)を形成する。このように高等植物の形態形成において, 後胚発生期のSAMとRAMは中心となる働きを担う組織である。

シロイヌナズナのSAMは, 機能的に異なるcentral zone (CZ), peripheral zone (PZ), rib zone (RZ)の3つの領域に分けられ, これらの領域は細胞分裂の頻度が異なる (Meyerowitz, 1997)。SAMの中心に位置するCZは最も低い分裂頻度を示す領域で, 少数の幹細胞を含む。CZで分裂した細胞の一部はCZ内に留まり未分化状態を維持するが, 多くの細胞はCZの周りのPZに移行する。PZは最も高い分裂頻度を示す領域で, ここに移行した細胞は活発に分裂をする。PZで分裂した細胞はさらに外側に移行し, そこで分化して器官原基を形成する。CZとPZの間間的な分裂頻度のRZはCZの下に位置する。ここで分裂した細胞は下方に移行し, 維管束や髄に分化する。また, このような区分とは別にSAMは組織学的な層構造の上から最表層のL1, その下のL2, さらにそれより内部の全てのL3の3つに区分できる。L1とL2を合わせて外衣(tunica), L3を内体(corpus)とも呼ぶ。L1, L2は垂層分裂をおこなうことにより, この層構造を維持する。それに対し, L3はランダムな分裂面での分裂をおこなう。L1の細胞は全て表皮に, L2は主として葉肉細胞などの表皮下組織に, そしてL3は維管束と髄に分化する。このようにしてSAMの構造と機能が維持されている。

シロイヌナズナにおいて, SAMの構造や機能に関わる遺伝子として解析の進んでいるものに *CLAVATA1*, *CLV2*, *CLV3*, *WUSCHEL (WUS)* がある。 *clv*突然変異体 (*clv1*, *clv2*, *clv3*)はいずれもよく似た表現型を示し, SAMの拡大とSAMの周囲に形成される原基の数

が増え, 葉序の乱れがおこる (Clark *et al.*, 1993)。SAMにおける分裂活性を指標とした組織学的な解析から, *clv3*突然変異体では分裂活性の低いCZ領域が広がっていることが示唆されている (Laufs *et al.*, 1998)。これらのことからCLV遺伝子は細胞分化の促進に関わる機能をもつと考えられている。 *clv*突然変異体に対して, *wus*突然変異体のSAMはCZの幹細胞を維持できず, SAMが消失するという表現型を示す (Laux *et al.*, 1996)。 *wus*突然変異体と*clv*遺伝子との二重突然変異体では, *wus*表現型を示すことから*clv*突然変異体の表現型にはWUS遺伝子の機能が必要であることが示されている (Schoof *et al.*, 2000)。さらに, *clv*突然変異体ではWUS遺伝子の発現領域が広がることから, CLV遺伝子がWUS遺伝子の発現抑制に関わることを示唆されている (Schoof *et al.*, 2000)。このことは, CLV3遺伝子を過剰発現させることにより, WUS遺伝子の発現が消失することからも指示されている (Brand *et al.*, 2000)。一方, WUS遺伝子を異所的に発現させるとSAMが拡大し, *clv*突然変異体様の表現型を示す。さらに, この植物ではCLV3遺伝子の発現領域が拡大していることが明らかにされている (Schoof *et al.*, 2000)。これらの解析から, シロイヌナズナのSAMにある幹細胞は, WUS遺伝子とCLV遺伝子のフィードバックループによりコントロールされるというモデルが提唱されている (Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000)。

WUS遺伝子はホメオドメインをコードする遺伝子で, その発現領域はCZのL3層の下にあるごく少数の細胞に限定されている (Mayer *et al.*, 1998)。 *clv1*, *clv2*, *clv3*突然変異体の表現型がよく似ていることは, CLV1, CLV2, CLV3遺伝子が同じ制御経路上にあることを示唆している。CLV1遺伝子はロイシンリッチリピートをもつレセプターキナーゼ様蛋白質をコードする (Clark *et al.*, 1997)。CLV2遺伝子はレセプター様蛋白質をコードし, CLV1蛋白質の安定性に関わる (Jeong *et al.*, 1999)。一方, CLV3遺伝子は96残基のペプチドをコードしており, このペプチドがCLV1, CLV2の複合体にリガンドとして結合する (Trotochaud *et al.*, 1999; Trotochaud *et al.*, 2000)。CLV3の発現領域は, 幹細胞のあるCZの上方に限定される (Brand *et al.*, 2000)。

CLV遺伝子, WUS遺伝子以外にSAMの形成や構造に関わる遺伝子としてSHOOT MERISTEMLESS (STM)遺伝子, ZWILLE/ PINHEAD (ZLL/PNH) 遺伝子がある (Barton and

Poething, 1993; Clark *et al.*, 1996; Endrizzi *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1996; Moussian *et al.*, 1998). *stm*突然変異体の中で表現型の強いアリルではSAMが完全に欠失する (Barton and Poethig, 1993). *STM*遺伝子はKNOTTED1タイプのホメオボックス遺伝子である(Long *et al.*, 1996). *STM*遺伝子は胚発生期のSAMの形成と未分化細胞の維持において重要な機能を果たしていると考えられている (Long *et al.*, 1998; Endrizzi *et al.*, 1996). *zll*突然変異体と *pnh*突然変異体はアレルである (McConnell and Barton, 1995; Moussian *et al.*, 1998). *zll*突然変異体では*STM*遺伝子の発現を維持できず, SAMの細胞が分化する. このことから, *ZLL*遺伝子はSAMの幹細胞の維持に関与すると考えられている(Moussian *et al.*, 1998). *ZLL*遺伝子は*ARGONAUTE1 (AGO1)* 遺伝子と同じファミリーに属する遺伝子で, ウサギから単離された翻訳開始因子eIF2Cとホモロジーのある蛋白質をコードしている(Bohmert *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1998).

シロイヌナズナのRAMはSAMに比較して細胞系譜が明確である. 成熟した根は, 維管束組織の周囲に内鞘・内皮・皮層・表皮が1層ずつある放射構造を成す. この規則的な構造はRAMの構造に由来する. RAMの中心には, 分裂活性のほとんどない4細胞から成る静止中心 (quiescent center, QC) と, その周囲には, 分裂活性を維持し機能の異なる4種の始原細胞 (12細胞のコルメラ始原細胞, 8細胞の皮層・内皮始原細胞, 16細胞の表皮・側部根冠始原細胞, 中心柱始原細胞) がある (Dolan *et al.*, 1993). これら各始原細胞はQCとの相対的位置を維持しながら, 連続的に分裂を繰り返して根の放射構造を形成する (Dolan *et al.*, 1993). 近年, RAMに異常を示す突然変異体の単離, その原因遺伝子の同定と機能解析から, このような根の形成メカニズムの一端が明らかにされつつある.

RAMにおけるQCの機能について調べるため, レーザー照射により4個のQC細胞のうちの1個を破壊し, 隣接する細胞の反応を調べるという研究がおこなわれている(van den Berg *et al.*, 1995). 破壊されたQCに接していたコルメラ始原細胞は, 分化したコルメラ細胞と同様デンプン顆粒を蓄積する. また, 皮層・内皮始原細胞は, 本来娘細胞でおこる並層分裂をする. QCが消失したことにより, 各始原細胞が分化したことを示している. これらの結果は, QCが周囲の始原細胞を未分化な状態に維持させる機能を持つことを示し

ている(van den Berg *et al.*, 1997).

根の放射構造の形成においては, *SHORT-ROOT (SHR)*遺伝子と*SCARECROW (SCR)*遺伝子の関与が報告されている (Benfey *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1995). *scr*突然変異体, *shr*突然変異体はそれぞれ内皮・皮層始原細胞の娘細胞で, 並層分裂がおこらない. その結果, 野生型では内鞘細胞列と表皮細胞列の間に内皮細胞列と皮層細胞列の2細胞列あるのに対して, *scr*突然変異体, *shr*突然変異体では1細胞列のみになる. *SCR*遺伝子は, GRASファミリーと呼ばれるb-ZIP型の転写因子をコードしている (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Pysh *et al.*, 1999). *SHR*遺伝子も, *SCR*遺伝子と同じくGRASファミリーに属する転写因子をコードしている (Helariutta *et al.*, 2000). このようによく似た表現型を示し, よく似た遺伝子であるにもかかわらず, 両遺伝子の発現領域は全く異なっている. *SCR*遺伝子はQC, 内皮・皮層始原細胞, その娘細胞, そして内皮細胞で発現するのに対し, *SHR*遺伝子は中心柱でのみ発現している (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Helariutta *et al.*, 2000). *shr*突然変異体では*SCR*遺伝子の発現量が減少することから, *SHR*遺伝子は*SCR*遺伝子の上流で, 細胞非自律的に機能していることが示唆されている (Helariutta *et al.*, 2000).

SAMとRAMは, このように一見異なる構造をもち, それぞれ固有のメカニズムにより制御されているように思われる. ところが, 中心に分裂活性の低い領域を持ち, その周囲に分裂活性の高い領域があるという構造上の観点から, SAMとRAMはよく似た体制を持つとも考えられている (Steeves and Sussex, 1989). そして, この類似は, SAMとRAMの構造と機能を維持するための共通した制御メカニズムが存在していることを示唆しているのかもしれない. トマトの *Defective embryo and meristem (Dem)*遺伝子の突然変異体では, SAMとRAMの両分裂組織において構造と機能の維持の異常が見られることが報告されている (Keddie *et al.*, 1998). このことは, この考えを支持するものであると考えられる.

最近, SAMの維持, 特にCZにあるとされる幹細胞集団の維持には*CLV3*遺伝子と*WUS*遺伝子の拮抗する働きが必要であることが示されている (Schoof *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2000). また, RAMではQCがコルメラ始原細胞をはじめとする始原細胞の分化を抑制

することが報告されている (van den Berg *et al.*, 1995). これらの研究報告は, SAMの幹細胞やRAMの始原細胞の維持はそれらと接する細胞群との相互作用によりおこなわれていることを示唆し, SAMとRAMの構造と機能の維持において共通するメカニズムの存在を支持するものである.

私は, このSAMとRAMの両方において構造の異常を示す一群の突然変異体に着目した. これらの突然変異体はSAMとRAMに共通した制御に関わる遺伝子の機能欠損変異体である可能性が高い. *cuc*突然変異体, *stm*突然変異体, *zll/pnh*突然変異体, *wus*突然変異体, *clv*突然変異体, *scr*突然変異体, *shr*突然変異体など, SAMあるいはRAM特異的な異常を示す突然変異体は多数報告されている (Aida *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1996; McConnell and Barton, 1995; Moussian *et al.*, 1998; Laufs *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 1993; Benfey *et al.*, 1993). しかし, SAMとRAMの両方に異常を示す突然変異体の報告はほとんどなかった. 私が解析した*fasciata (fas)*突然変異体は, 花茎の帯化, 葉序の異常, 根の伸長遅延を示す突然変異体であることがすでに報告されていた (Leyser and Furrer, 1992)が, SAMとRAMでの詳細な表現型解析, 原因遺伝子の単離・同定はおこなわれていなかった. そこで, 私は*fas*突然変異体の表現型のうち花茎の帯化と葉序の異常はともにSAMの異常を, 根の伸長遅延はRAMの異常をそれぞれ示唆するものと考え, 研究を進めた.

本研究では, 以下のことについて報告する. *fas*突然変異体はSAMとRAMの構造と機能の維持に異常があること. これらの要因の一つとして, SAMあるいはRAMの構造の維持に関わる重要な遺伝子とされている*WUS*遺伝子あるいは*SCR*遺伝子の発現パターンが異常であることを示した. 加えて, *FAS1*, *FAS2*遺伝子のコードする蛋白質はそれぞれヒトchromatin assembly factor-1 (CAF-1) のp150, p60サブユニットとホモロジーがあった. この*FAS1*, *FAS2*蛋白質は*in vitro*において複合体を形成し, その複合体はDNA複製に依存したヌクレオソームのアセンブリー活性を持つことも示した. これらのことから, おそらく*FAS*蛋白質はシロイヌナズナにおけるCAF-1のカウンターパートとして機能しているだろうと結論した. 今回, 解析した*fas1*, *fas2*突然変異体はCAF-1の機能が欠損した高等多細胞生物の突然変異体としては初めての報告であり, 多細胞におけるCAF-1の機能を明らかに

する上で貴重な手がかりとなると考えている.

CAF-1は複製されつつあるDNA依存的にヌクレオソームアセンブリー活性をもつ蛋白質としてヒト細胞核抽出液より単離された (Smith and Stillman, 1989). CAF-1は, p150, p60, p48の3つのサブユニットから成る複合体である (Smith and Stillman, 1989). 以来, CAF-1が新規に合成されたヒストンH3/ H4と核内において複合体を形成すること (Verreault *et al.*, 1996; Kaufman *et al.*, 1995), 増殖中のヒト細胞においてDNA複製フォーク上に局在すること (Krude *et al.*, 1995; Shibahara and Stillman, 1999) が明らかにされている. CAF-1はヒトからショウジョウバエ, 酵母に至る真核生物において広く存在し, 機能している (Kaufman *et al.*, 1995; Bulger *et al.*, 1995; Kaufman *et al.*, 1997). これらのことは, *in vivo*においてCAF-1がDNA複製に伴うヌクレオソーム形成を担う因子であることを示唆している.

CAF-1はDNA複製期の複製フォークの通過後, クロマチンの再構築を迅速におこなうことによりDNA複製後の発現状態を安定に維持するメカニズム (例えば, エピジェネティック情報の維持など) に関わることが報告されている (Enomoto *et al.*, 1997; Kaufman *et al.*, 1997; Monson *et al.*, 1997; Enomoto and Berman, 1998). 実際, 酵母のCAF-1機能欠損変異体では, テロメア近傍あるいは接合に関わる*HM*遺伝子座の発現抑制状態を細胞分裂を通して維持できなくなることが報告されている (Enomoto *et al.*, 1997).

CAF-1はDNA複製期にproliferating cell nuclear antigen (PCNA) と蛋白質間相互作用をする (Jonsson and Hubscher, 1997; Shibahara and Stillman, 1999). PCNAは3量体を形成しDNA複製期にDNAポリメラーゼをDNA上につなぎ止める機能を持ち, DNA複製の進行に不可欠な因子である (Waga and Stillman, 1998). 酵母のPCNA遺伝子の欠損変異体は, 細胞増殖過程においてテロメア近傍遺伝子あるいは*HM*遺伝子座領域の遺伝子発現の抑制状態を安定に維持できないことから, PCNA遺伝子はDNA複製に伴うエピジェネティック情報の維持に関わるとされている (Zhang *et al.*, 2000). この表現型は酵母CAF-1の機能欠損変異体と同じである (Enomoto *et al.*, 1997; Kaufman *et al.*, 1997; Monson *et al.*, 1997; Enomoto

and Berman, 1998). これらのことより, CAF-1, PCNA複合体によるDNA複製時のクロマチン形成がエピジェネティック情報の維持に関与していると考えられている (Zhang *et al.*, 2000). エピジェネティックスとはDNAの塩基配列に変化が無いのに, 特定の形質が細胞分裂を経て娘細胞に伝わることであるが, そのメカニズムや伝達される情報の本体は不明である. しかし, 伝達されるエピジェネティック情報の一つに, クロマチン構造が重要な役割を果たしていることが示唆されている. ショウジョウバエでは, ホメオティック遺伝子の発現パターンによって体節のアイデンティティーの決定が成されるが, このホメオティック遺伝子の発現パターンが消失した後も, その情報がクロマチン構造に記憶されている. これらに関わるものとしてTrihorax遺伝子群, Polycomb遺伝子群が同定されている (Orlando *et al.*, 1995).

以上のことを踏まえて, 今後検証すべき仮説として, FAS遺伝子産物はシロイヌナズナのCAF-1として機能し, DNA複製に伴うヌクレオソームの形成時にエピジェネティック情報の維持を通して遺伝子の発現制御に関わり, それによって後胚発生過程におけるSAMとRAMの構造と機能の維持に関与しているだろう, という仮説を提唱する.

なお, FAS蛋白質の*in vitro*での解析は柴原慶一博士 (Cold Spring Harbor Laboratory, 現所属; 科学振興事業団若手研究者推進事業) との共同研究による. また, シロイヌナズナ培養細胞を用いた細胞増殖刺激あるいは形質転換BY-2を用いた細胞周期同調によるFAS遺伝子の発現解析は田岡健一郎博士 (京都大学大学院理学研究科生物科学専攻植物学系, 現所属; 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科) との共同研究によっておこなわれたものである.

方 法

1) 材料と生育条件

実験に用いた植物は, 野生型として*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Columbia (Col), ecotype Landsberg *erecta* (Ler), ecotype Enkheim (En), ecotype Nossen (No) である. 植物体は通常, バーミキュライト (商品名バーンピース: シンセイミクロン株) を入れたプラントポット丸形2号 (大和プランティック) あるいは3.5号鉢上で, 23°C, 白色光連続照射下において生育させた. 無菌栽培は, 0.8% 寒天あるいは0.3%ゲランガム (WAKO) を含むムラシゲとスクーグ培地 (3%ショ糖を含むMS培地, Murashige & Skoog Complete Medium-50x: Gibco BRL) に表面滅菌した種子を播種し, 発芽を同調させるために4°Cに3日以上置いた後, 23°C, 白色光連続照射の培養器 (SANYO)に移しておこなった. 種子表面滅菌は滅菌溶液 (5 % ハイター, 0.02% TritonX-100) に種子を15分間浸し, 滅菌水で5回洗浄しておこなった.

2) *hosoba toge toge* (*hot*)の単離

vacuum infiltration法 (荒木・賀屋, 2000)により, 野生型Columbia (Col)をpCGN1547 (McBride and Summerfelt, 1990)由来のバイナリーベクターで形質転換して得られたT-DNAタグライン (荒木, 未発表) から, 本葉が細く, 葉縁が鋸歯状を示す突然変異体として単離した (vTAAT26C51).

3) *fasciata* (*fas*) 突然変異体の単離

野生型Enから*fas1* (Reinholz, 1966)が, 野生型Lerから*fas2* (Leyser and Furner, 1992)がそれぞれすでに単離されていた. ethyl methanesulfonate (EMS)処理をした野生型No(荒木, 未発表) から8系統の*fas*様突然変異体を得た. 対立性検定をおこない, *fas1*と*fas2*突然変異体のアレルとして4系統を得た. *fas1*を*fas1-1*に, *fas2*を*fas2-1*にそれぞれ再命名した上

で, *fas1*-2 (NoM2-50-#103/*fas*), *fas1*-3 (NoM2-82-*fasV*), *fas2*-2 (NoM2-96-*fasX*), *fas2*-3 (NoM2-23-*fasW*)をそれぞれ*fas*突然変異体のアレルに加えた.

4) シロイヌナズナからのゲノムDNA調製

(a) 少量調製 (PCRの鋳型など)

芽生えの子葉あるいは本葉1~2枚をKONTESチューブ (749520-0000 CONTESS GLASS COMPANY) に採取し, 100 μ lのPlant DNAzol (Gibco BRL) を加え, KONTES乳棒でホモジナイズした後, Plant DNAzol (Gibco BRL) の添付の説明書の記載に従い, 調製した.

(b) 大量調製 (ゲノムライブラリーの作製・サザンゲルプロットなどで使用)

無菌栽培で発芽後7日程度の植物体の地上部のみ数グラム程度を液体窒素をいれた50ml遠沈管 (住友ベークライト) に投入し, ガラス棒 (直径, 1cm) でホモジナイズした. 液体窒素を蒸発させた後, DNAzol (Gibco BRL) を適量加え添付の説明書の記載に従い, 調製した. 得られた標品は塩化セシウム密度勾配遠心法により精製した.

5) ゲノム libraryの作製

シロイヌナズナ野生型 (Col) と*hot*突然変異体の芽生えから, 大量調製法によりゲノムDNAを調製した. 得られたゲノムDNAを*Sau3*AIで部分分解し, 分解後粘着末端のC, T塩基だけをKlenow fragment (宝酒造) で埋めた. T4 DNA ligase (宝酒造) により, ゲノムDNA断片をLambda FIXII /XhoI partial Fill-in Vector (Stratagene) に挿入した. フェージへのパッケージングには, GigapackII XL Packaging Extract (Stratagene) を用いた.

6) TAIL-PCR法によるLB-植物ゲノム領域の回収

基本的には劉らの方法に従った (Liu *et al.*, 1995). T-DNA (pCGN1547由来) のLB領域に3つの特異的プライマー (LB2, LB3, LB4) を設計した. 少量調製法により調製した*hot*突然変異体のゲノムDNAを鋳型に任意プライマー (OP1) を用いてTAIL-PCRをおこない, 植物ゲノムとT-DNA LB配列を含むLB2断片 (約0.5kbp) を得た. LB2をpBluscript IISK+ (Stratagene) にリクローニングして, pHOT-LB2を得た.

LB2; 5'-CGGATCGTAATTTGTCGTTTTATCA-3'

LB3; 5'-ATAACGCTGCGGACATCTACATTT-3'

LB4; 5'-TTTCTCCATATTGACCATCATACTC -3'

OP1; 5'-GTNCGA(G/C)(A/T)CANA(A/T)GTT-3'

7) DNAゲルプロット解析

大量調製法により調製したゲノムDNAを制限酵素で切断し, 1%アガロースゲルで電気泳動した. アルカリ緩衝液 (0.4M NaOH) を用いたペパータオルによるキャピラリー法により, 電気泳動で分画したゲノムDNAをHybond N+ (Amersham)に転写させた. ³²Pラベルしたプローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液 (5xSSPE, 5xDenhardt's, 0.5% SDS, 0.1ml サケ精子 DNA) に転写させたメンブレンをハイブリバック SP-1 (ビーエム) 中で浸し, 65°Cで一晩ハイブリダイズさせた. *FAS1*, *FAS2*遺伝子のプローブにはRT-PCR産物のcDNAを用いた. ハイブリダイゼーション後のメンブレンを下記のlow, high stringency条件で洗浄した. ³²Pプローブの調製には, Megaprime DNA Labelling System, dCTP (Amersham) を用い添付の説明書の記載に従った.

low stringency; 2xSSC 55°C 20min 2回

high stringency; 2xSSC 65°C 20min 2回, 0.1xSSC 65°C 10min 1回

8) 植物組織あるいは培養細胞からの全RNAおよびpoly(A)⁺RNAの調製

液体窒素中でホモジナイズした組織あるいは培養細胞にTRIzol (GIBCO BRL) を適

当量加えた後、添付の説明書の記載に従い全RNAの抽出をおこなった。全RNAからの **poly(A)⁺ RNA** の調製は、Oligotex-dT30<Super> mRNA Purification Kit (宝酒造) を用いておこなった。

9) RT-PCR

組織あるいは培養細胞より調製した全RNAを鋳型にして、oligo(dT)プライマーと SuperScriptII RNase H- (Gibco BRL) を加え、逆転写反応をさせた。得られたcDNAを鋳型に適切なプライマーを用いてPCR反応をおこなった。

10) RT-PCRを用いた組織別*FAS1*, *FAS2*遺伝子の発現解析

つばみ、花、受粉後の花から5mm以下の鞘、5mm以上の鞘、茎、茎葉、ロゼット葉、根の各組織から全RNAを調製し、RT-PCRにより*FAS1*, *FAS2*遺伝子の発現を調べた。PCRの反応条件は、94°C 1min, 60°C 2min, 72°C 2min /35 cycles。

FAS1

FAS1RT-1; 5'-GCT GAT GTT TTG GAG GAT GAT TCT G-3'

FAS1RT-4; 5'-ACC ATT TTA TCA TTT CCC TCA TCT C-3'

増幅産物: 2189bp,

FAS2

FAS2RT-1; 5'-TAA CCG TAG ATT TTC ACC CGA TTT C-3'

FAS2RT-2; 5'-TGC TTT TTC TCC TCA CCA TCA ACA G-3'

増幅産物: 1135bp

11) RNA ゲルブロット解析

組織、培養細胞から調製した RNAあるいは**poly(A)⁺ RNA**をグリオキサール法で電気泳動した。電気泳動により分画したRNAを、アルカリ緩衝液(0.05N NaOH)でHybond N+

(Amersham) にDNA gel blot解析と同様に転写した。³²Pでラベルしたプローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液 (50% ホルムアミド, 5xSSPE, 5xDenhardt's, 0.5% SDS, 0.1ml サケ精子 DNA) 中、42°Cでハイブリダイゼーション反応を一晩おこなった。ハイブリダイゼーション後のメンブレン洗浄は、2xSSC 65°C 20min 2回, 0.1xSSC 65°C 10min 1回の条件でおこなった。

12) *FAS1*, *FAS2*, *AtMSI1*蛋白質の発現

FAS1, *FAS2*, *AtMSI1* 遺伝子のcDNAはRT-PCRによりクローニングした。PCRの鋳型としてシロイヌナズナ培養細胞T87の全RNA由来のcDNAを用いた。各プライマーの配列は下に示した。*FAS1*cDNAの増幅に用いた5' プライマーはT7 RNA ポリメラーゼの認識配列をもつ。このPCR断片を鋳型に転写・翻訳させた。*FAS2* cDNAのRT-PCR断片は*EcoRI*, *SalI*で処理した後、pBlueScriptII SK+の*EcoRI*, *SalI*サイトにクローニングした。さらに、pET28a (Novagen) の*EcoRI*, *XhoI*サイトにリクローニングした。*AtMSI1* cDNAのRT-PCR断片は*EcoRI*, *BamHI*で処理した後、pBlueScriptII SK+の*EcoRI*, *BamHI*サイトにクローニングした。さらに、pCITE2a (Novagen) の*NcoI*, *BamHI*サイトにリクローニングした。PCR断片、各plasmid を鋳型にして、*in vitro*で転写と翻訳をした。転写と翻訳にはTNT Quick Coupled Transcription / Translation System (ウサギ網状赤血球) (Promega) を採用し、添付の説明書の記載に従った。

FAS15T7; 5'-AGT ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AAA CAG ACA CCA TGG ACG AAG TTT CGA CG -3'

FAS1RE-4; 5'-ACG CGT CGA CCA AAT AAA GAT GGA AAC TGT G-3'

FAS2 RE-1; 5'-CCG GAA TTC ATG AAG GGA GGT ACG ATA CAG A-3'

FAS2 RE-2; 5'-ACG CGT CGA CAA AAA CAC TGA TGG AAA ATG AC-3'

AtMSI1 RT-1;5'-GGA ATT CCA TGG GGA AAG ACG AAG AGG AAA T-3'

AtMSI1 RT-2;5'-GCG GAT CCT GCG CTT TGG ATA CTA AAT AAC A-3'

13) FAS1/FAS2/AtMSI1複合体形成能とDNA複製依存的ヌクレオソームの形成能

の解析

*in vitro*で発現させたFAS1, His-FAS2, AtMSI1は緩衝液A200 (25mM Tris-HCl pH8.0, 0.1 mM EDTA, 10%, グリセロール, 200mM NaCl, 0.01% NP-40) 中で, Ni-NTAアガロースビーズ (Qiagen) と共に4°C下においた. 2時間経過後, アガロースビーズを同じ緩衝液で5回洗浄した. 洗浄後, アガロースビーズと共沈した蛋白質をSDS-PAGEで分画した.

ヌクレオソーム形成実験 (Shibahara and Stillman, 1999; Shibahara *et al.*, 2000) には, two-step systemを用いた.

14) 成熟胚の形態観察

Runningらの方法 (Running *et al.*, 1995)を一部改変した. 10%エタノールに種子を浸し, 4°Cで一晩以上固定した. エタノールシリーズで脱水した後, キシレンに置換したものを標品とした. 共焦点レーザー顕微鏡はLMS410 (Zeiss) を用いた.

15) テクノビット樹脂切片の作製と観察

組織をFAA固定液 (3.7% ホルムアルデヒド, 50% エタノール, 5% 酢酸) 浸潤させ, 4°Cで一晩固定した. 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99.5%のエタノールシリーズに各15分間, 100% (モレキュラーシープで脱水したもの) に1時間浸して脱水した. 添付の説明書の記載に従い, 脱水した組織をテクノビット7100 (Kulzer) に包埋した. マイクロトーム (Leica RM2155) で厚さ4μmの切片を作製し, カバーガラスに貼付けた. 0.5%トルイジンブルーで数秒間染色し, 脱イオン水で脱染した. 検鏡は, Axiophoto (Karl Zeiss) でノマルスキー微分干渉によりおこなった. 図はPhotoshop Ver.5.5 (Adobe) で輪郭が明確になるように画像処理をおこなった.

16) 根の伸長速度の測定

垂直に立てたMS培地 (0.7% ゲランガム, 3% ショ糖) プレート上で生育させた. 栽培後4日目から8日目まで2日間隔で, 主根の胚軸と根の境界部から根端までの長さを測定した. 根の伸長速度は, 1日あたりの伸長率(mm/day)で示した.

17) デンプン顆粒染色

基本的には深城らの方法(Fukaki *et al.*, 1998)に従った. 垂直に立てたMS培地 (0.7% ゲランガム, ショ糖は含まない) プレート上で生育させた. 栽培後3日目の芽生えを染色液 (2% w/v ヨウ素, 5% w/v ヨウ素カリウム, 20% w/v 包水クロラル) に10秒程浸したあと, プレパレート上に移し透明化液 (包水クロラル 8g, グリセロール 1ml, 脱イオン水 2mlを混合する) を数滴垂らし, 上にカバーガラス乗せた. 検鏡は, Axiophoto (Karl Zeiss) でノルスキー微分干渉によりおこなった. 図はPhotoshop Ver.5.5 (Adobe) で輪郭が明確になるように画像処理をおこなった.

18) 共焦点レーザー顕微鏡によるRAMの観察

垂直に立てたMS培地 (0.7%ゲランガム, ショ糖含まない) プレート上で生育させた. 根をヨウ化プロピディウム (PI) 溶液 (10mg/ml) に数分浸した後, スライドガラスに移して根端を傷つけないようにカバーガラスを乗せた. 共焦点レーザー顕微鏡は, LSM 410 (Karl Zeiss) を用いた. PIの励起波長は543nm, 蛍光検出波長は590nm. GFPの励起波長は488nm, 蛍光検出波長はBP505-550nm.

*fas*突然変異体におけるpSCR/GFPの発現解析には, pSCR/GFP株(Wysocka-Diller *et al.*, 2000), この株と*fas1-1*突然変異体と掛け合わせたF2世代目の株を用いた. F2の種子は深城英弘博士, P. Benfey博士 (New York University) より分与して頂いた.

19) *FAS1*, *FAS2* 遺伝子のプロモーター/ β -Glucuronidase(GUS)の構築

(a) pFAS1(1.0)/GUS/Nos-ter

pFTgenome (小林恭士・荒木 崇, 未発表) の平滑末端 *Hind*III-SspI断片をpZErO-2.1 (INVITROGEN) の *Eco*RV サイトにリクローニングし, pFAS1 (1.3SspI) を構築した. pFAS1 (1.3SspI) の粘着末端 *Hind*III-平滑末端化 *Xho*I断片をpBI101の *Hind*III-*Sma*IサイトにリクローニングしpFAS1(1.0)/GUS/Nos-terを構築した. この際, FAS1とGUSの翻訳融合タンパク質間に13残基のリンカーがついた. pFAS1(1.0)/GUS/Nos-terは, *FAS1* 遺伝子の予測翻訳開始点から上流1029bpと下流294pb (98アミノ酸) を含む.

(b) pFAS2(3.0)/GUS/Nos-ter

pFAS2genome-Cから *Eco*RI-*Cla*I断片をpBlueScriptII SK+の *Eco*RI- *Cla*IサイトにリクローニングしpFAS2(3.0)を構築した. pFAS2(3.0)の *Bam*HI-部分分解-*Eco*RV断片をpBI101.3の *Bam*HI-*Sma*IサイトにリクローニングしpFAS2(3.0)/GUS/Nos-terを構築した. この際, FAS2とGUSの翻訳融合タンパク質間に6残基のリンカーがついた. pFAS2(3.0)/GUS/Nos-terは, FAS2遺伝子の予測翻訳開始点から上流2928bpと下流108bp (36アミノ酸) を含む.

20) 形質転換シロイヌナズナの作製

基本的には荒木・賀屋 (2000) の方法に従った. 2号ポット(大和プラスチック) にバーミキュライトを入れ, 台所用ゴミネット (プラスチック製) で覆いをし, ネットのメッシュ間にポットあたり約10粒を播種した. 4°C暗所に7日間ほどおいた後, 24°C白色光連続照射下に移し発芽させた. 10日後, 発育のよい5個体を残し, 以外は間引いた. 2~3週間後, 数cmに抽台した主軸を根本で摘心した. 4~7日間側軸を発育させた後, 結実したさやは除いた. この植物を形質転換に用いた. 感染には, アグロバクテリウム(C58 pMP90) の形質転換体を用いた. 選択抗生物質を含む250ml, LB培地で一晚培養した形質転換アグロバクテリウムを5,000rpm 20分間の遠心で集菌し, 等量の浸潤用懸濁培地 (1/2xMS塩, 1/2 Gamborg B5ビタミン, 5% ショ糖, 0.044 μ M ベンジルアミノプリン,

0.02% Silwet L-77) に懸濁した. 植物体の地上部を逆さにして, この懸濁液に浸けた状態で, デシケーターに移し37cmHgに減圧し, 4分間維持した. 透光性の湿箱の中に, ポットを横にしておき, 生育条件下で一晩生育させた. 湿箱から取り出し, 通常の生育条件下で種子が成熟するまで生育させた. 種子は袋掛けによる回収をせず, 適宜回収した. 選択抗生物質 (カナマイシン25mg/l, カルベニシリン100mg/l) と0.8%寒天を含むMS培地で無菌栽培し, 根の長さを指標に, 伸長のよいものを形質転換体として選抜した. 選抜した個体を地植して生育し, 得られた種子を解析に用いた.

21) GUS染色

芽生えの植物体をGUS染色液 (1mg/ml X-Glucシクロヘキシルアンモニウム塩, 50mM NaPi, 0.3% TritonX-100, pH7.0) に浸し, 減圧条件下で5分間おいた後, 37°Cで16時間反応させた. FAA固定液中4°Cで一晩固定後, 50%, 70%, 80%, 90%のエタノールシリーズに各30分間, 99.5%エタノールに一晩浸け脱色した. 脱色後90%, 80%, 70%, 50%, 30%のエタノールシリーズで水和させた. 実体顕微鏡観察には, さらに脱イオン水で水和し, 検鏡した. 顕微鏡観察には, スライドガラス上で透明化液 (包水クロラル 8g, グリセロール 1ml, 脱イオン水 2mlを混合する) に浸し, 透明化後検鏡した.

22) *in situ* RNAハイブリダイゼーション

Digoxigenin (Dig) ラベルプローブはT3またはT7 RNA ポリメラーゼによる*in vitro*転写系DIG RNA Labeling kit (SP6/T7) (Roche Diagnostics) を用い調製した.

FAS1 プローブの鋳型には, cDNA (Accession Number; AB027229) の1536-2454領域919bpのPCR産物をpBluescript II SK+ (Stratagene) にリクローニングしたものを用いた.

WUS プローブの鋳型には, 全長ORFを含む1102bpのPCR産物をpBluescript II SK+ (Stratagene) にリクローニングしたものを用いた.

組織はPFA固定液 (4%パラホルムアルデヒドを含むPBS溶液) またはFAA固定液 (3.7% ホルムアルデヒド, 50% エタノール, 5% 酢酸) に浸潤させ, 4°C条件下でそれぞれ 8 時間, 2 時間固定した. PFA固定液で固定した場合は, 4°C条件下にて, PBS溶液で30 分間 2 回洗浄し, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%のエタノールシリーズで各30分間ずつ脱水させた後, 0.1% エオシンを含む95%エタノールに一晩おいた. FAA固定液で固定した場合は固定後, 50%エタノールから始め, 以後はPFA固定の場合と同様におこなった. 以後はすべて室温でおこなった. 100%エタノール (モレキュラーシープで脱水させたもの) 中で30分間2回, 60分間2回脱水した後, 25%, 50%, 70%になるようにレモゾール (和光純薬) 溶液を60分おきに加えた. 100%レモゾールに2回60分間浸し, レモゾール溶液に置換した. 置換後, パラプラスト+ (OXFOR) を加え, 一晩おいた. 60°Cでパラプラスト+を溶解させたのち, 予め融解させておいたパラプラスト+と交換した. このパラプラスト+融解液の交換を1日 2 回, 3日間おこなった. 組織を滅菌プレートに移し, 室温で固めた. マイクロトーム (Leica RM2155) を用いて厚さ8 μ mの連続切片を作製した. 切片は3-アミノプロピルロトリエトキシシラン (APS) でコートしたスライドグラス (松浪硝子工業) に貼付けた. ハイブリダイゼーションは, Braissant と Wahli (Braissant and Wahli,1998)の方法を改変したM. Heisler (私信. 同氏の許可を得て石田哲也博士よりプロトコールのコピーを入手した) の方法に従った. スライドグラスをレモゾール溶液中に10分間浸す, これを2回繰り返した. 100%, 95%, 滅菌水に各5分間浸し, 水和させた. 2xSSC溶液に15分浸した後, proteinase K溶液 (1 μ g/ml proteinaseK, 100mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8.0) 中, 37°Cで 20~30分間作用させた. グリシン溶液 (2mg/ml グリシンを含むPBS溶液) に2分間, PFA溶液 (4% パラホルムアルデヒドを含むPBS溶液) に10分間, DEPC溶液 (0.1% 未変性DEPCを含むPBS溶液) に15分間2回, 5xSSC溶液に15分間浸した. 80°C 10分間熱変性させた300 μ lのプレハイブリ溶液 (5xSSC, 50% ホルムアミド, 40 μ g/ml サケ精子DNA) をスライドグラス上にのせ, パラフィルムでカバー, 湿箱に移し58°Cで2時間, プレハイブリダイゼーション反応をおこなった. プレハイブリ溶液を除き, 50 μ lのハイブリダイゼーション溶液 (DIG標識プローブ100ngを含むプレハイブリダイゼーション溶液) をのせ, パラフィルム

でカバー, 湿箱に移し, 58°Cで16時間以上ハイブリダイゼーション反応をおこなった. ハイブリダイゼーション後の洗浄は, 2xSSCに室温で1時間, 65°C の0.1xSSCに1時間浸しておこなった. 抗体結合反応は, 予め40°Cに保温した緩衝液1 (0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.5) に浸し, そのまま室温に移し15分間, DIG抗体溶液 (アルカリフォスファターゼ結合抗DIG抗体) (Roche Diagnostics) を緩衝液1で5000倍希釈, 0.5% ブロッキング試薬 (Roche Diagnostics) 中で2時間おこなった. 未結合抗体の除去洗浄には, 緩衝液1で15分2回浸した. 発色反応は, 緩衝液3 (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂, pH9.0) に5分間浸した後, スライドグラスに200 μ lのNBT/BCIP溶液 (NBT/BCIP (Roche Diagnostics) 20 μ l, 緩衝液3 1mlを混合する) をのせ, カバーグラスを掛け, 室温暗所で24~48時間発色させ, TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5) に浸して発色を止めた. 検鏡は, Axiophoto (Karl Zeiss) でノマルスキー微分干渉によりおこなった. 図はPhotoshop Ver. 5.5 (Adobe) で輪郭が明確になるように画像処理をおこなった.

23) シロイヌナズナ培養細胞の植え継ぎと増殖刺激後の発現解析

シロイヌナズナ培養細胞T87は, 100mlのJPL培地で明所下で培養した. 7日間隔で, 4mlのpacked cell volume (PCV) の培養細胞を100mlの新鮮な培地に植え継いだ. 植え継ぎ後, 1日間隔で細胞を採取した. 0日目は植え継ぎをする直前の細胞である. 採取した培養細胞からpolyA RNAを調製し, RNAゲルブロット解析により発現量を調べた. もちいたプローブには各RT-PCR断片を用いた. [³H]-thymidineの取り込みを指標にして, DNA合成を調べた.

各断片の増幅に用いたprimerと増幅断片のサイズ.

FAS1遺伝子

FAS1RT-1; 5'-GCT GAT GTT TTG GAG GAT GAT TCT G-3'

FAS1RT-4; 5'-ACC ATT TTA TCA TTT CCC TCA TCT C-3'

増幅産物: 2189bp,

FAS2遺伝子

FAS2RT-1; 5'-TAA CCG TAG ATT TTC ACC CGA TTT C-3'

FAS2RT-2; 5'-TGC TTT TTC TCC TCA CCA TCA ACA G-3'

増幅産物: 1135bp,

シロイヌナズナヒストンH4(H4A748)遺伝子

H4 RT-1; 5'-GAA GAT TGG CTC GTA GAG GTG GAG T-3'

H4 RT-2; 5'-CAC CGA ATC CGT AAA GAG TCC TTC C-3'

増幅産物: 201bp,

AtDRH1遺伝子 (Arabidopsis DEAD box ATPase/RNA helicase 遺伝子)

DRH RT-1; 5'-GAA GCA GCA ATG GAT GGG GAA GAG A-3'

DRH RT-2; 5'-TTC ATC TGT GTT TCA TCA TCA TCG T-3'

増幅産物: 135bp.

24) 形質転換タバコ培養細胞BY-2の作製とタバコ培養細胞BY-2の細胞周期同調化後の発現解析

タバコ培養細胞BY-2の形質転換は, Huh らの方法 (Huh *et al.*, 1997) に従いおこなった. 細胞周期同調化と半定量的RT-PCRによるNPTII, GUS遺伝子の発現量の測定は田岡らの方法 (Taoka *et al.*, 1999)に従いおこなった.

結 果

1) *FAS1*遺伝子の機能欠損変異体である*hot*突然変異体

(a) *hot*突然変異体の単離と表現型

hot (*hosoba toge toge*; 細葉棘々, クローン名 vTAAT26C51) 突然変異体は, 荒木により作出された約1600ラインのT-DNA挿入変異体の中から, 本葉の形態異常を指標にしたスクリーニングにより得られた. 本葉は, 発芽後の後胚発生において, SAMから形成される最初の器官である. この器官の形態に異常が認められることは, SAMに何らかの異常が起こっていることが予想される. *hot*突然変異体は, 地上部だけでなく地下部の根においても表現型異常を示し, その表現型は多面的であった (後述). *hot*突然変異は劣性変異で, 観察された多面的な表現型異常はすべてのT-DNAのマーカーであるカナマイシン耐性表現型と共分離した (データを示さず). このことは, T-DNAの挿入部位と観察した表現型異常の原因となる遺伝子の位置が一致していることを示した.

*hot*突然変異体の地上部では, 発芽後, 第一, 第二本葉の出現が遅い (Fig. 1 B-C). *hot*突然変異体の本葉は長さは正常であるのに対して, 幅が小さいために全体として細い (Fig. 1 E-H; Fig. 2 B). 茎葉も同じく細い. また, 葉の縁は鋸歯状であった (Fig. 1 I, J). 本葉に形成される, トライコームの形態にも異常が見られた. 野生型では3本の枝をもつトライコームが80%以上を占めた. それに対して*hot*突然変異体では, 3本のものが約60%に下がり, 4本, 5本の枝を持つトライコームの比率が野生型に比べ高くなっていた (Fig. 2 C). さらに, *hot*突然変異体では花成遅延 (Fig. 3 A, B), 2本以上の主花茎の出現が見られ (Fig. 3 C, D), 花茎の帯化 (Fig. 3 E, F), 花茎上に二次的なロゼットの形成などの表現型が見られた (Fig. 3 J, K). 花では, 萼や花弁の形態が葉で観られたように細く (Fig. 2 D; Fig. 3 G, H)なり, さらに雄しべの数もやや少なくなる表現型 (野生型 5.8 ± 0.4 [n=25], *hot*突然変異体 5.4 ± 0.7 [n=25])も見られた. しかし, *hot*突然変異体では器官のホメオティックな転換などは見られず, 花の基本的な構造は正常であった. *hot*突然変異体は地下部でも異常が見られた. 根の伸長速度は遅く (Fig. 1 D), 根冠から根毛を形成している細胞まで

の間が狭く、外見上根端の構造異常が認められた (Fig. 1 K, L).

このように *hot* 突然変異体は地上部、地下部において多面的な表現型異常を示す。ところが発芽直後の芽ばえの体制形態にはほとんど異常が見られなかった (Fig. 1 A)。子葉や胚軸、そして幼根は胚発生過程で形成される器官であるが、それらの大きさ、形状は正常であった (Fig. 2 A, B)。 *hot* 突然変異体で異常が認められた組織や器官は、すべて胚発生後のSAMあるいはRAMから形成された器官に特異的である。このことより *hot* 突然変異体は後胚発生のSAMとRAMの両方に異常を示す突然変異体ではないかと考えた。

(b) *hot* 突然変異体は *FAS1* 遺伝子と *FT* 遺伝子の両方の機能に欠失を持つ

hot 突然変異体で観察された表現型の中で、特に本葉の細化と花茎の帯化と根の伸長遅延は、これまでに報告されている突然変異体の *fasciata1 (fas1)* 突然変異体、花成遅延は *fi* 突然変異体の表現型に似ていた。 *FAS1* 遺伝子と *FT* 遺伝子はともに第一染色体の下腕にマップされており、両遺伝子間の遺伝的距離も非常に近い (Leyser and Furner, 1992; Koornneef *et al.*, 1991)。 T-DNA 挿入変異体である *hot* 突然変異体では、 *FAS1* と *FT* の両遺伝子の機能に欠損がある可能性が考えられた。そこで、 *hot* 突然変異体と *fas1*、 *fi* 突然変異体との間で対立性検定をおこなった。 *hot* 突然変異体と *fas1* 突然変異体の F1 個体では、本葉は細く、花茎も帯化した。しかし、花成時期については野生型表現型を示した。一方、 *fi* 突然変異体との F1 個体では、花成時期は遅いが、本葉と花茎の形態については野生型表現型を示した。これらの結果から、 *hot* 突然変異体は、 *FAS1*、 *FT* 両遺伝子に欠損を持つ変異体であることが判明した。

hot 突然変異体で観察した表現型のうち本葉の細化や花茎の帯化などの地上部と、根の伸長遅延など地下部での異常の原因は *FAS1* 遺伝子の機能欠損であることが判った。よって、 *FAS1* 遺伝子が SAM と RAM の両方で機能する遺伝子であろうと考え、今後は、 *FAS1* 遺伝子を含め *FAS* 遺伝子についての研究を進めることにした。

2) 花茎帯化表現型を示す *fasciata (fas)* 突然変異体の遺伝解析

fasciata (fas) 突然変異体である *fas1*、 *fas2* 突然変異体は、Leyser と Furner により花茎の帯化や根の伸長遅延を示す突然変異体として報告されていた (Leyser and Furner, 1992)。 *fas* 突然変異体の地上部における特徴的な表現型は花茎が帯化することである。この特徴的な表現型を示す突然変異体を新たに9株単離した (Table 1)。石黒澄衛博士 (京都大学大学院理学研究科生物科学専攻植物学系) より分与して頂いた株を加え、計12株を用いて、交配実験をおこない、3つの遺伝子座に分類した。4株は未分類である。その中で本研究では、 *FAS1* と *FAS2* の2つの遺伝子に焦点を当てて解析をおこなった。 *fas1*、 *fas2* 突然変異体以外の *fas* 突然変異体については、今後解析をおこなう必要がある。

FAS1、 *FAS2* 遺伝子はそれぞれ第一染色体上の88.0cM付近、第五染色体上56.0cM付近に座乗する (Leyser and Furner, 1992)。 *fas1* 突然変異体には、 *fas1-1*、 *fas1-2*、 *fas1-3* のアレルが、 *fas2* 突然変異体には *fas2-1*、 *fas2-2*、 *fas2-3* のアレルがある。それぞれの野生型親株と変異原については表にまとめた (Table 1)。

解析の結果、 *fas1* と *fas2* 突然変異体の表現型は非常によく似ていることがわかったので、以下の記述では *fas* 表現型として記述した。

3) 成熟胚における *fas* 突然変異体の表現型

fas 突然変異体の成熟種子における胚の体制と形態は野生型と比べ基本的に同じである (Fig. 4 A, B)。芽生えの子葉、胚軸は野生型と明らかな差異が認められなかった。

後胚発生期において地上部全ての器官を形成する場となるSAMも胚発生期に形成されるが、胚発生期のSAMは少数の細胞層から成るドーム構造を形成する (Fig. 4 C)。 *fas1* 突然変異体のSAMでは、細胞の層構造に異常はなく細胞の数も変わらなかった (Table 2)。しかし、SAMが横方向に長く (Table 2)、野生型のドーム状構造に比べて平坦である傾向があった (Fig. 4 C, D)。これに対して *fas* 突然変異体と同様、花茎の帯化や葉序の異常をしめす *chl3* 突然変異体の胚発生期のSAMはドーム構造を保っているが、野生型に比べ大きく細胞数も増えている (Clark *et al.*, 1995)。

SAMと同様RAMも胚発生期に形成される。*fas*突然変異体の幼根のRAMは野生型と区別がつかなかった(Fig. 4 E, F). このことは、胚発生期のRAMの形成にはFAS遺伝子の機能は必須ではないことを示唆している。

4) SAMにおける*fas*突然変異体の表現型

*fas1-1*突然変異体のSAMの拡大、本葉の鋸歯化についてはすでに報告があった(Leyser and Fruner, 1992) が、下記に述べるそれ以外の*fas1*突然変異体の表現型および、*fas2*突然変異体、*fas1;fas2*二重突然変異体の表現型については、今回新たな知見である。

SAMは、後胚発生過程で本葉、花茎、茎葉、花など地上部全ての器官を次々に形成する組織である。そこで、芽生えのテクノビット樹脂切片を用いて、SAMの構造を調べた。野生型ではSAMのL1, L2にある細胞は常に垂層分裂を繰り返す、一方でL3にある細胞はランダムな分裂面で分裂する。また、分裂活性の高い細胞のサイズは小さく、液胞も未発達である。そのため、SAMの断面では、L1, L2の2層の明瞭な細胞層を含む、トルイジンブルーにより濃く染色される6~7の細胞層が見られた(Fig. 5 A, C). 野生型のSAMでは、細胞配列とトルイジンブルーによる細胞染色性の強弱を手がかりに、CZとPZ領域を特定することが可能であった(Fig. 5 C). それに対し、*fas*突然変異体のSAMは、野生型に比べ横方向に拡がり、さらに、L1, L2の細胞層が乱れていた。また、トルイジンブルーにより濃く染色される細胞層も3~4層に減少し、CZやPZ領域の区別も困難であった(Fig. 5 B, D). これらのことから後胚発生期のSAMでは、構造と機能の維持に異常が起きていると考えた。特に、*fas1-2*ではSAMのドーム状構造が崩壊し、SAMが盛り上がったと考えられる構造物が観察される個体もあった(Fig. 5 E). しかし、その一方で*fas*突然変異体であっても野生型と似たSAMの構造をもつ個体もあり、*fas*突然変異体のSAMの異常の程度には同じアレルであっても個体間で差があった。

SAMでの異常は芽生えの本葉の形態に反映されると予測した。そこで、本葉の形態に注目し、観察した。寒天上で生育させた*fas*突然変異体の本葉(特に第一、第二本葉)の多くは野生型に比べ幅が狭いため全体として細く、葉縁は鋸歯状になる。さらに、この様

な表現型よりも強い表現型を示す個体もあった。例えば、本葉がフィラメント状の構造体になる個体も見られた(Fig. 5 G, H). また、野生型に比べSAMが大きくなり、肉眼で同定できる程度になる個体も見られた(Fig. 5 I). この個体をさらに生育させると、本葉の代わりにフィラメント状の構造体2本を形成した状態のまま白色化し、枯死した。この様に本葉で見られる表現型の程度にも個体差が見られた。

一方、土壌で生育させた個体では本葉が細くなる表現型が緩和され、野生型と区別がつかない個体がよく見られた。寒天と土壌で生育させた個体で見られる表現型の程度には違いがあった。これらの観察結果は生育環境と表現型には相関があることをうかがわせる。

生殖生長期の*fas*突然変異体は、花茎の帯化を示す(Fig. 5 H, J). しかし、この帯化の程度、すなわち帯化した花茎の幅は個体間で異なっていた。詳細な解析はおこなっていないが十数本もの花茎が帯化した個体や野生型と区別がつかない個体も観察された。SAMや本葉で観察された個体間での表現型の程度の変動が花茎でも観察された。また、*fas*突然変異体では葉(本葉と茎葉)が細くなるが、花卉や萼も同様に幅が狭くなり全体として細くなっていた。

地上部の本葉、茎、花などのほとんどの器官で異常が観察されたが、これらは地上部全ての器官を形成する場であるSAMの異常が原因であると考えられる。

5) RAMにおける*fas*突然変異体の表現型

2週間育てた*fas1-1*, *fas2-1*突然変異体の根の長さについてはすでに報告があった(Leyser and Fruner, 1992) が、下記に述べるそれ以外の根の表現型、RAMの構造異常などの表現型については、今回新たな知見である。

*fas*突然変異体は、根の伸長遅延を示す。主根の伸長速度を調べたところ、*fas*突然変異体では野生型に比べ遅いことを示した(Table 3). *fas*突然変異体で見られた根の伸長遅延の原因として、根端で何らかの異常が生じていることを考えた。そこで、根端領域を実体顕微鏡で観察し、比較した(Fig. 6 A-D). 根端は先端から順に根冠、細胞分裂領域、細

胞伸長領域，細胞分化領域の各領域に分かれ，分化領域にある細胞の特徴として根毛が見られる．*fas*の根冠から伸長領域と分化領域の境界までの長さを測定したところ，*fas*突然変異体では野生型に比べ短かった (Table 4)．また，根冠，細胞分裂領域が細くなる個体もあり，RAMの構造に異常が見られた．そこで共焦点レーザー顕微鏡によりRAMの細胞構造を詳細に調べた (Fig. 6 E-J)．野生型のRAMの細胞構造は整然として明確で，各組織と各始原細胞は細胞配列から容易に同定できた．RAMの中心にはQCが存在し，周囲にはコルメラ始原細胞を含め4種の始原細胞が存在する (Fig. 6 K)．これら始原細胞はQCとの相対的位置を認識し，連続的に分裂を繰り返すことによりRAMの構造が維持されている (Dolan *et al.*, 1993)．*fas*突然変異体では，コルメラ，表皮，皮層，内皮，内鞘のどの組織も消失していないが，それらの細胞配列には乱れが生じていた．特にQCとコルメラ始原細胞，コルメラ細胞付近にその異常が顕著にみられ，皮層細胞列，内皮細胞列をもとにQCとコルメラ始原細胞を特定することは不可能であった (Fig. 6 F, G, I)．このことは，QCの機能維持，コルメラ始原細胞の維持と分裂制御に異常が起こっていることを示唆した．そこで，コルメラ細胞の分化マーカーであるデンプン顆粒をヨウ素デンプン反応を用いて染色することでコルメラ細胞を特定し，さらにそれらとの位置関係からコルメラ始原細胞とQCを同定することを試みた (Fig. 6 L-R)．野生型ではQCと接する位置にあるコルメラ始原細胞は水平分裂し，2つの細胞になる．そのうち，QCと接する細胞はコルメラ始原細胞として維持される．一方，QCと接しない方の細胞はコルメラ細胞に分化する．デンプン顆粒は分化したコルメラ細胞にのみ蓄積する (van den Berg *et al.*, 1995) (Fig. 6 L, N)．*fas*突然変異体では，コルメラ細胞でのデンプン顆粒の蓄積は観察できたが，細胞の位置関係からコルメラ始原細胞，QCを特定することはできなかった (Fig. 6 M, O, Q)．さらに，表皮細胞列，皮層細胞列との位置関係からQC細胞とコルメラ始原細胞の位置にあたると考えられる細胞においてもデンプン顆粒の蓄積が観察された．このことは，QCやコルメラ始原細胞の維持にも異常が生じていることを示唆している．

*fas*突然変異体の中にはRAMの構造異常を示す個体のみならず，逆に野生型と差異が認められない構造の個体もみられた．SAMで観察されたように，RAMの表現型異常の

程度は個体間で変異があることを示している．

6) *fas1; fas2*二重突然変異体の表現型

*fas1*と*fas2*のF2個体から，表現型上*fas1; fas2*二重突然変異体の同定することはできなかったことが報告されている (Leyser and Furner, 1992)．その理由としては，二重突然変異体は致死になるか，あるいは各単独の突然変異体と見分けがつかない可能性が考えられている (Leyser and Furner, 1992)．そこで， $\Delta FAS1$ (*hot*突然変異体) と*fas2-2*突然変異体あるいは*fas1-1*突然変異体と*fas2-2*突然変異体のF2個体から，それぞれの変異塩基配列 (塩基置換部位については後述する) を調べることで二重突然変異体を同定した．同定した二重突然変異体のSAMでは細胞配列の異常，花茎の帯化も見られたが，その異常は各単独変異体と比較して同程度であった (Fig. 5 B, D, F, H, J, K)．さらに，根の伸長速度を調べたところ，*fas1*，*fas2*各単独突然変異体そして*fas1; fas2*二重突然変異体もほぼ同程度であった (Table 2)．さらに，RAMでの異常も同程度であった (Fig. 6 F, G, J, M, O, P)．この様に，*fas1*と*fas2*突然変異体の効果は相加あるいは相乗ではないことから，*FAS1*と*FAS2*遺伝子は同じ経路で機能していることが示唆され，*FAS1*，*FAS2*蛋白質が複合体として機能している可能性が考えられた．

7) *FAS1*遺伝子の同定

(a) *hot*突然変異体のT-DNA挿入部位の構造

*FAS1*遺伝子の単離・同定をおこなうにあたり，T-DNAタグ突然変異体である*hot*突然変異体のT-DNA挿入部位を調べた．*hot*突然変異体は*FAS1*と*FT*遺伝子の機能欠損変異体であることから，T-DNAの挿入時に，逆位，転座，欠失など染色体の大きな再編成が起きた可能性を考えた．そこでまず，*hot*突然変異体に形質導入されたT-DNAのLB，RB，neomycin phosphotransferase II (NPTII)の各領域をプローブに*hot*突然変異体ゲノムに対してDNAゲルブロット解析をおこなった (Fig. 7 A)．その結果，少なくともRB領域を欠失していることが判明した (データを示さず)．*hot*突然変異体ではT-DNA挿入時，RB領域と共に

ゲノムの一部に欠失が起こった可能性が高い。まず、染色体再編の様態を解析するために T-DNA と隣接する両端の植物ゲノム配列を調べた。欠失していないことが判っている LB 領域の配列を基に TAIL-PCR をおこない、LB 配列と植物ゲノム配列を持つ約 500bp の hotLB2 断片を得た。この断片の塩基配列をもとにホモロジー検索をおこなった結果、植物ゲノム由来の配列は第一染色体上の下腕に位置する BAC の F5I14 クローン (Accession Number; AC001229; 109560bp) の配列の一部と同一であった。次に、もう一方の T-DNA 末端と植物ゲノムのジャンクションを調べた。DNA ゲルブロット解析の結果から、挿入された T-DNA は RB を欠失していることが示唆されたので *hot* 突然変異体由来のゲノムライブラリーを作製し、このライブラリーから NPTII をプローブにスクリーニングをおこなった。その結果、T-DNA と植物ゲノム配列の両方をもつ pHK3 クローンを得た。pHK3 の配列を調べたところ、nopaline syntase (NOS) terminator 配列の途中で植物ゲノム配列に置き換わっていた。このことから T-DNA の挿入に伴い、T-DNA 上の RB を含む約 4kbp の領域が欠失していたことが明らかになった。pHK3 の植物ゲノム配列を基にホモロジー検索をおこなった結果、この配列は先と同じ BAC の F5I14 クローンの一部と同一であった。すなわち、挿入された T-DNA の両端と接する 2 つの植物ゲノム配列は 1 つの BAC 上にあり、その間の距離は 75,878bp であった (Fig. 7 B)。75.8kbp 領域中の複数の断片をプローブに用いて、*hot* 突然変異体のゲノムに対して DNA ゲルブロット解析をおこなったところ、ハイブリダイズするバンドは検出できなかった (データ示さず)。これらの結果から次のことが明らかになった (Fig. 7 A)。1) *hot* 突然変異体では T-DNA の挿入に伴い *FAS1-FT* 領域 (F5I14 上の位置 2151-78028) 75.8kbp の領域が欠失している。2) T-DNA の RB を含む約 4kbp の領域が欠失している。

T-DNA がゲノム DNA に挿入される際に、RB, LB 配列と相同性のあるゲノム配列との間で非正統的組換えが起こるとされている (Tinland, 1996)。*hot* 突然変異体では RB 領域が欠失しており、NOS terminator 配列がゲノム配列に隣接していた。そこで、LB 配列あるいは NOS terminator 配列と欠失した付近の植物ゲノム配列を比較した。挿入部位の LB 配列と接する側では、LB 配列と高い相同性をもつ配列がみとめられた (Fig. 8)。一方、T-DNA の

Nos terminator 配列と欠失した右端の配列の間では有意なホモロジーはなく (Fig. 8)、T-DNA の末端の 12bp の重複がおきていた。

(b) *FAS1* 遺伝子の同定と遺伝子構造

Plant Gene Expression Center による BAC クローン F5I14 についての注釈では、*hot* 突然変異体で欠失している *FAS1-FT* 領域 (75.8kbp) には 14 個の ORF 領域が存在すると予想されている。この領域の配列を用いて、ホモロジー検索、予測スプライスサイトの位置などを検討して遺伝子の構造を再度予測したところ、15 個の遺伝子が存在していると考えた (Fig. 7 B)。これらのうち、1 つは *FT* 遺伝子であった (Kobayashi *et al.*, 1999)。

BAC クローン F5I14 とそれにオーバーラップするクローン T8F5 (Accession Number, AC004512) 上で、*hot* 突然変異体で欠失しているとされる 15 個の遺伝子の ORF 領域内について、EMS 処理により塩基置換が起こっていることが期待される突然変異体 *fas1-1*, *fas1-2* 突然変異体で塩基置換等の変異の有無を調べた。15 個の遺伝子の ORF 領域について配列を調べる際、下記の基準を設定してその順番を決めた。1) 既存の遺伝子とホモロジーがあると注釈されている遺伝子。例えば、ヒト Type II Inositol-1, 4, 5-phosphatase (IP5Pase) (F5I14. 11) (Jefferson and Majerus, 1995), ヒト N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) β -chain (F5I14. 11+ F5I14. 11) (O'Dowd *et al.*, 1985), tomato polygalacturonase 7 (F5I14. 10) (Accession Number, AF072732), *Arabidopsis thaliana* z-crystallin-like protein (NADPH oxidoreductase) (F5I14. 10), *Zea mays* leaf permiase 1 (F5I14. 8) (Schultes *et al.*, 1996), *Arabidopsis thaliana* endo-1, 4- β -glucanase とホモロジーのある ORF。2) RT-PCR や RNA ゲルブロット解析などで発現が確認された遺伝子。3) EST クローンとホモロジーのある遺伝子。すべての遺伝子の ORF 領域について調べた結果、Plant Gene Expression Center による注釈ではホモロジーのなかった 1 つの遺伝子 (F5I14. 2) の ORF 領域中に、両突然変異体において塩基置換が検出された (Fig. 7 E)。この遺伝子 (F5I14. 2) が *FAS1* 遺伝子である可能性が十分高いと考えた。F5I14. 2 は推定 406 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードし、そのアミノ酸配列はヒトの chromatin assembly factor-1 (CAF-1) p150 サブユニットの N 末の一部と低いながらもホモロジーが認め

られた。しかし、次の2つの考えでこのORF (F5I14. 2)は、*FAS1*遺伝子の全長ではないと推測した。まず、146bp離れたところにF5I14. 2と同じ方向に翻訳される次のORF領域 (F5I14. 1/T8F5. 24)が予測されている (Fig. 7 E)。この146bpの中にF5I14. 2のターミネーターとF5I14. 1/T8F5. 24のプロモーター領域が共存する可能性は低いと考えた。次に、F5I14. 2がCAF-1のp150サブユニットをコードする遺伝子のホモログであると仮定すると、938アミノ酸残基からなるp150サブユニットに対して406アミノ酸残基からなるF5I14. 2は小さい。そこで、F5I14. 2とF5I14. 1/T8F5. 24のORFは一つの遺伝子であると仮定し、これを検証した。両ORF領域内に設計したプライマー (FAS1 RT-1, RT-2) を用いて (Fig. 7 C)、シロイヌナズナ芽生え由来の全RNAに対してRT-PCRをおこなったところ、推定した遺伝子構造から予想されるのとはほぼ同じサイズのPCR産物を得た。さらに、得られたPCR産物の配列が、F5I14. 1/T8F5. 24領域由来であることを、塩基配列より確認した。この結果は、両ORFは一つの遺伝子であることを示した。さらに、この領域由来とえられるESTクローン (106J1) の塩基配列を決定したが、その結果は両ORFが1つの遺伝子であることを支持した。これらの結果から、構造を確定した*FAS1*遺伝子は11のexonから成り、815アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていた (Fig. 7 C; Fig. 9 A)。

(c) 予想されるFAS1蛋白質とCAF-1 p150とのホモロジー

同定した*FAS1*遺伝子の予測アミノ酸配列は、ヒトCAF-1のサブユニットの一つであるp150と相同性が認められた (Fig. 9 A, B)。CAF-1は複製しつつあるDNA依存的にヌクレオソームをアセンブリーさせる活性として、ヒト細胞核抽出液中より精製された複合体蛋白質である (Smith and Stillman, 1989)。ヒトCAF-1はp150, p60, p48の3つのサブユニットから成り、各サブユニットはヒストンH3/H4と結合することが*in vitro*の実験で明らかになっている (Verreault *et al.*, 1996; Kaufman *et al.*, 1995)。出芽酵母からもp150のホモログであるCac1pが生化学的に単離されている (Kaufman *et al.*, 1997)。推定FAS1蛋白質は815アミノ酸であるのに対して、p150は938アミノ酸、Cac1pは606アミノ酸である。蛋白質のサイズは3者の間で異なるが、ドメイン構造はよく似ていた (Fig. 9 B)。p150にはリジン (K)、グル

タミン酸 (E)、アルギニン (R) を多く含み、コイルドコイル構造を形成することが推測されるKERドメインがある。このドメインについてはFAS1とp150、FAS1とCac1pの間でそれぞれアミノ酸配列上30% (69%)、30% (65%)の同一性 (類似性) があった。また、酸性アミノ酸のグルタミン酸 (E) とアスパラギン酸 (D) を多く含むED領域があり、この領域は塩基性蛋白質であるヒストンと結合することがヒトCAF-1 p150を用いた*in vitro*の実験で示されている (Kaufman *et al.*, 1995)。この領域においてFAS1とp150、FAS1とCac1pの間でそれぞれ53% (81%)、30% (70%)の同一性 (類似性) があった。また、FAS1, p150, Cac1pの予測等電点 (pI) はそれぞれ5.4, 5.5, 6.4で、すべて酸性蛋白質であった。さらに、p150にはRobbins & Dingwallによる解析プログラム (<http://psort.nibb.ac.jp>) で、8箇所の核移行シグナルの存在が予測され、p150の抗体染色実験から、実際に核に局在することが示されている (Shibahara and Stillman, 1999)。同じプログラムを用いたところFAS1には4箇所の核移行シグナル配列が予測されたので、FAS1も核に局在すると推測される。

fas1-1, *fas1-2*突然変異体では、それぞれ152番目と328番目のコドンが翻訳終結コードに置き換わっていた (Fig. 9 A)。そのため*fas1-1*の翻訳産物はKERドメイン、ED領域、C末端領域を、*fas1-2*の翻訳産物はED領域、C末端領域を欠くことが予想された。*in vitro*において、ヒトp150のED領域とC末端領域はヒストンとの結合やヌクレオソームのアセンブリー活性に必要な領域であることが示されている (Kaufman *et al.*, 1995)。これらに加え、*fas1-1*, *fas1-2*の表現型は、*FAS1*遺伝子のプロモーターの転写開始点近傍及び第一エクソンを欠失している*hot*突然変異体と比較してもほとんど差がなかった。これらの理由から、*fas1-1*, *fas1-2*と*hot*はともにnon-functional変異体であると推測した。

8) FAS2遺伝子の同定

fas1, *fas2*突然変異体の表現型解析から、*FAS1*遺伝子と*FAS2*遺伝子は同一の経路で機能し、FAS1蛋白質とFAS2蛋白質は複合体を形成して機能する可能性が考えられた。予想されるFAS1蛋白質のアミノ酸配列はCAF-1の3つあるサブユニットのうちのp150とホモロジーがあった。これらのことから、*FAS2*遺伝子産物は残りの2つのサブユニットの

一つとホモロジーを持つ可能性が考えられた。シロイヌナズナのゲノム中には、ヒトのCAF-1のp60サブユニットをコードする遺伝子と非常に高い相同性を持つ遺伝子が第5染色体上に存在することが、かずさDNA研究所より報告されている。一方、FAS2遺伝子は第5染色体上に座乗することが報告されている (Leyser and Furner, 1992)。そこで、この遺伝子の予測ORF領域について*fas2-1*, *fas2-2*突然変異体から抽出したゲノムDNAの塩基配列を調べた。両突然変異体は、EMS処理により塩基置換が生じていると予測される。調べた結果、それぞれ1ヶ所の塩基置換を検出した。さらに、このORFを含む約7kbpゲノム領域は*fas2-2*の表現型を野生型に回復させることができることを確かめ、FAS2遺伝子であると判断した。

推定FAS2蛋白質は487アミノ酸で、ヒトのCAF-1のサブユニットの一つp60、酵母のCac2pと高い相同性を示した (Fig. 9 C, D)。この3つの蛋白質は、ともに蛋白質間相互作用に関わると考えられるWD-40ドメインの7回繰返し構造を持つ。この領域におけるホモロジーは高く、FAS2とp60、FAS2とCac2pとの間でそれぞれアミノ酸配列上42% (74%), 39% (78%)の同一性 (類似性) を示した。

*fas2-1*突然変異体では、塩基置換のためORF上162番目の残基が翻訳終結コドンに置換していた (Fig. 9 C)。そのため*fas2-1*における翻訳産物は4番目のWD-40までの蛋白質であると予測された。*fas2-2*突然変異体では、塩基置換はスプライシングの際に認識されるアクセプターサイト上にあった。そこで、*fas2-2*突然変異体の芽生えからRT-PCRによりFAS2遺伝子のmRNA由来のcDNAを増幅させ、その塩基配列を調べた。その結果、スプライス認識サイトが1塩基内側にずれていることを確認した (Fig. 9 E)。おそらく、これに伴い翻訳枠もずれ、FAS2翻訳産物には76番目のアミノ酸以降に野生型と異なるアミノ酸が付加されたものになると予想された (Fig. 9 E)。

ヒト、酵母、シロイヌナズナで保存されている7回繰返しのWD-40が、*fas2-1*, *fas2-2*の翻訳産物では欠失していることと、*fas2-1*と*fas2-2*の表現型が非常に似ていることから、両突然変異体はnon-functional変異体であると考えた。

9) FAS1, FAS2遺伝子のコピー数

シロイヌナズナのゲノムにおけるFAS1, FAS2遺伝子のコピー数を次の2つの手法により検討した。まず、high stringencyとlow stringency条件下でDNAゲルブロット解析をおこなった。その結果、両条件下で同じハイブリダイゼーションパターンを得た (データ示さず)。次に、ほぼ全ての塩基配列の決定が終了しているシロイヌナズナのゲノムデータベースに対してホモロジー検索をおこなったところ、両遺伝子のいずれに対しても有意にホモロジーのある遺伝子は見つからなかった。これらの結果から、FAS1, FAS2遺伝子はシロイヌナズナにおいて単一コピー遺伝子であると判断した。

10) FAS1, FAS2, AtMSI1蛋白質によるFAS複合体形成とCAF-1活性

以下に記述する実験において、発現ベクターの構築は申請者がおこない、*in vitro*での蛋白質発現、共沈実験、ヌクレオソーム形成実験、マイクロコッカルヌクレアーゼ消化実験は、柴原慶一博士 (Cold Spring Harbor Laboratory, 現所属 科学技術振興事業団若手研究者研究推進) におこなっていただいた。なお、実験の一部では申請者自身も貢献した。

ヒトCAF-1はp150, p60, p48の3つのサブユニットから成り、出芽酵母CAF-1も3つのサブユニットから成る (Smith and Stillman, 1989; Kaufman *et al.*, 1995)。このことからFAS1蛋白質とFAS2蛋白質がCAF-1として機能するためには3番目サブユニットが必要であると考えられた。そこで3番目の候補サブユニットとしてAtMSI1蛋白質を選択した。シロイヌナズナからは酵母MSIのホモログ (Ruggieri *et al.*, 1989) として4つのAtMSI遺伝子が報告されている (Ach *et al.*, 1997; Kenzior *et al.*, 1998)。ヒトのp48をコードする遺伝子もマルチコピー遺伝子でファミリーを形成するが、このこととp48ホモログがシロイヌナズナにおいても4コピー存在することは符合している。4つの遺伝子のうちヒトp48と最も高い相同性をもつのはAtMSI1遺伝子である。まず、FAS1, FAS2蛋白質とAtMSI1蛋白質の複合体形成能を*in vitro*において調べた。*in vitro*転写・翻訳システムを用いて³⁵SラベルしたFAS1, Hisタグ-FAS2, AtMSI1蛋白質を用い、共沈実験をおこなった。その結果、Hisタグ-FAS2とともにFAS1, AtMSI1蛋白質が共沈した (Fig. 10 A, lane 3)。Hisタグ-FAS2を含まな

い場合は、Ni-NTAレジンを用いてもFAS1, AtMSI1は共沈しなかった (Fig. 10 A, lane 2). FAS1, AtMSI1単独ではNi-NTAには結合しなかった (Fig. 10 A, lane 5, 7). このことは, *in vitro*においてFAS1, FAS2, AtMSI1が複合体を形成することを示している. また, AtMSI蛋白質のホモログであるAtMSI1, AtMSI2, AtMSI3, AtMSI4蛋白質を用いて, 結合実験をしたところ, AtMSI1がもっとももっとも強く複合体を形成した (データ未示).

*in vitro*の実験結果より, ヒトCAF-1はDNA複製期において新規に合成された裸のDNA上にヒストンH3/H4をアセンブリーさせて, 速やかなヌクレオソーム構築に関わることが示されている (Smith and Stillman, 1989). そこで, 新規DNA複製に伴うFAS1/FAS2/AtMSI1複合体のヌクレオソームのアセンブリー活性を調べるために, two-stepアッセイシステム (Shibahara and Stillman, 1999; Shibahara *et al.*, 2000)を用いた. SV40の*in vitro*複製系において新規に合成されるDNAを³²Pでラベルした反応液に, ヒストン, トポイソメラーゼとヒトの293細胞由来のS100抽出液, そして*in vitro*で合成したFAS1, FAS2, AtMSI1蛋白質を加えた. トポイソメラーゼ活性存在下において, ヒトCAF-1はヒストンを閉鎖環状DNA上にリクルートし, ヌクレオソーム構築を負のスーパーコイル状にする. スーパーコイルDNAと閉鎖環状DNAとは, 電気泳動上移動度が異なる. form Iの位置にある³²Pラベルされたバンドは, 新規に合成されたDNAが負のスーパーコイル状にあることを示している. コントロールに用いたヒトCAF-1では³²PでラベルされたDNAでのみform Iのバンドが形成される (Fig. 10 B lane 2). このことは複製DNAに依存してヌクレオソーム形成がおこなわれていることを示している. 3倍量でFAS1/FAS2/AtMSI1複合体を加えたところ³²PラベルされたDNAにおいてform Iの位置にバンドを確認し (Fig. 10 B, lane 10上のパネル), 同時に³²PラベルのないDNAではform Iの位置にバンドが見られなかった (Fig. 10 B lane 9, 10 下のパネル). FAS1とFAS2, FAS1とAtMSI, FAS2とAtMSIのみでは, form Iの位置にバンドが検出できない (Fig. 10 B lane 3-8上のパネル). このことは, ヌクレオソームの形成にはFAS1, FAS2, AtMSIの3つサブユニットすべてが必要であることを示している.

FAS1/FAS2/AtMSI1複合体により形成されたform Iの位置にあるバンドがヌクレオソーム構築を形成していることを確かめるために, マイクロコッカルヌクレアーゼによる

消化実験をおこなった. その結果, ヒトCAF-1とFAS1/FAS2/AtMSI1複合体により形成されたform I DNAのlaneにおいて, mono-, di-ヌクレオソームを検出した (Fig. 10 C). これらの結果は, シロイヌナズナのFAS1, FAS2蛋白質はCAF-1p150, p60と同じ機能を持つことを示唆した.

11) *fas*突然変異体の頂端分裂組織における遺伝子の発現の解析

*fas*突然変異体では, SAMとRAMの両方で構造と機能の維持に異常が見られた. これまでに詳細な解析がなされ, SAMやRAMの構造や機能の維持に関わる遺伝子としてWUS遺伝子とSCR遺伝子がある. SAMが拡大する*clv3*突然変異体では, その拡大に対応してWUS遺伝子の発現領域が広がる (Schoof *et al.*, 2000). 一方, 根の細胞列が1列消失し根の構造以上を示す*shr*突然変異体では, SCR遺伝子の発現量が減少する (Helariutta *et al.*, 2000). SAMの拡大やRAMの構造異常が見られる*fas*突然変異体においても, WUS, SCR遺伝子の発現に異常が起こっている可能性がある. 出芽酵母CAF-1の機能欠損変異体は細胞増殖過程において遺伝子の抑制状態を安定に維持できないことから, CAF-1はDNA複製後の発現状態を安定に維持すること (エピジェネティック情報の維持) に関連があると考えられている (Enomoto and Berman, 1998, Zou *et al.*, 2000). CAF-1と同様の機能を持つと考えられるシロイヌナズナのFAS1/FAS2/AtMSI1複合体も遺伝子の発現制御に関与している可能性が考えられる.

fas1, *fas2*突然変異体において, 表現型異常が観察されるSAMあるいはRAMにおいてそれぞれWUSCHEL (WUS)遺伝子とSCARECROW (SCR)遺伝子の発現パターンを調べた. WUS遺伝子はホメオドメインを持つ蛋白質をコードし, SAMのCZの下部, 特にL3層の限られた少数の細胞群でのみ発現する (Schoof *et al.*, 2000). WUS遺伝子を発現している細胞の上層には幹細胞があり, WUS遺伝子は幹細胞の維持に重要な機能を果たしている (Mayer *et al.*, 1998). WUS遺伝子の発現を芽生えのSAMを用いて*in situ* RNA ハイブリダイゼーションにより調べた. 野生型ではWUS遺伝子は少数の細胞で発現し, その発現ドメインは小さな円形を示した (Fig. 11 A, E). それに対して*fas*突然変異体では横方向に引き延ばさ

れたような発現ドメインが観察された (Fig. 11 B-D, F). この横方向への発現ドメインの拡がりとはSAMの構造上の拡がりとはよく一致していた. また, *WUS*遺伝子を発現する細胞層も上層細胞にシフトアップし, L2層や, L1層で観察される個体もあった. さらに, SAMの形態異常と同様, *WUS*遺伝子の発現パターンの詳細は個体間で変異が見られた.

*SCR*遺伝子はGRASファミリーに属するb-ZIP型蛋白質をコードし (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Pysh *et al.*, 1999), 内皮・皮層始原細胞の娘細胞で起こる不等分裂に関わる (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Wysocka-Diller *et al.*, 2000). *SCR*遺伝子はQCと皮層・内皮始原細胞, その娘細胞, 内皮細胞で発現する (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Wysocka-Diller *et al.*, 2000). *SCR*遺伝子の発現は, 2.5kbpの*SCR*プロモーターの制御下で発現するgreen fluorescence protein (GFP) の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した. この*pSCR/GFP*から発現されるGFPの蛍光パターンは*in situ* RNAハイブリダイゼーションの解析結果と一致することから, この蛍光は*SCR*の発現を正確に反映していると考えられている (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Wysocka-Diller *et al.*, 2000).

野生型では, *pSCR/GFP*の発現はQC, 内皮・皮層始原細胞, その娘細胞と内皮細胞で認められた (Fig. 12 A). それに対して, *fas*突然変異体での*pSCR/GFP*の発現パターンに異常が認められた. まず, 根の発生ステージの進行に伴ってその異常が顕著になる. コルメラ細胞の細胞列が少ないことから未成熟と判断される若い根のRAMでは, 野生型に似たパターンが観察された (Fig. 12 B). ところが, 成熟したRAMでは異所的な発現と発現の消失が観察された (Fig. 12 C-L). 次に, この異所的発現と消失は本来*SCR*遺伝子を発現すべき細胞と接して, 共通の親細胞に由来する細胞に限定されていた. 例えば, コルメラ始原細胞や皮層細胞で異所的な発現が観察された. これらの細胞は本来*SCR*遺伝子を発現するQCあるいは皮層内皮始原娘細胞と接している (Fig. 12 C-E). 一方, 内皮細胞の一部や, 皮層・内皮始原細胞など, 本来発現する細胞での発現消失も観察された (Fig. 12 D, F-L). さらに, *fas*突然変異体のRAMにおける*pSCR/GFP*の蛍光パターンは個体間あるいは, 同一個体でも根端間で変異が認められた (Fig. 12 B-L).

12) *FAS1*, *FAS2*遺伝子の発現解析

FAS1, *FAS2*遺伝子がどのような組織で, 細胞周期のどの時期に発現しているのかを知るために, RT-PCRを用いた組織別発現解析, *in situ* RNAハイブリダイゼーション法による発現パターンの解析, 転写開始点近傍のシスエレメントの解析, プロモーターGUS (β -glucuronidase) 融合遺伝子の発現解析, 細胞周期同調系を用いた発現解析をおこなった. 以下, 順をおってその結果を述べる.

(a) RT-PCRによる組織別発現解析

成熟シロイヌナズナの各組織から全RNAを抽出し, RT-PCRにより*FAS1*, *FAS2*遺伝子の発現の有無を調べた. 調べたすべての組織(芽生え, 本葉, 花茎, 花, つぼみ, 鞘, 根)で両遺伝子の発現が確認された. しかし, 定量性に欠けるこのRT-PCRによる発現解析では, 組織間での発現量の程度については信頼性のある推測はできない.

(b) *in situ* RNAハイブリダイゼーションによる発現解析

*FAS1*遺伝子の発現パターンについて, 魚雷型胚から種子が登熟・乾燥するまでの胚発生後期において経時的に観察した. 用いたプローブの特異性は, *FAS1*遺伝子を欠失している*hot*突然変異体でシグナルが検出されないことにより確認した (Fig. 13 H). 魚雷型胚期では, *FAS1*遺伝子は顕著な発現する少数の細胞群が複数存在し, 胚全体ではパッチ様の発現パターンが観察された (Fig. 13 A-C). この発現パターンは, *FAS1*遺伝子の細胞周期依存的な発現を反映しているのかもしれない. SAMの構造は胚発生後期 (ベンディングコチレドン期) に二枚の子葉の間に完成する (Barton and Poethig, 1993). *FAS1*遺伝子の発現は, SAMの完成に先行するようにして, この領域に限定された (Fig. 13 B). RAMでは, SAMの場合の様な*FAS1*遺伝子の発現は見られない (Fig. 13 B-D). 種子の乾燥期にステージが進行すると, *FAS1*遺伝子の発現も消失した (Fig. 13 E).

次に, 後胚発生過程のSAMでの*FAS1*遺伝子の発現パターンを調べた. 野生型の芽生えのSAMで, *FAS1*遺伝子の発現を観察した. *FAS1*遺伝子はSAMのCZ, PZと葉原基で発現していた (Fig. 13 F, G). 特にCZでは, 発現している個々の細胞間で発現量の差があ

り、SAM全体でパッチ様の発現パターンを示した (Fig. 13 F). この発現パターンは、胚発生過程で観察されたものと似ていた (Fig. 13 A). また、*FAS1*遺伝子を発現している細胞の割合はCZでは少ないが、PZや葉原基では多いように思われた (Fig. 13 F, G). PZや葉原基は、CZに比べ分裂活性の高い領域であることから、*FAS1*遺伝子の発現と細胞分裂には相関があると考えられた。

*FAS1*遺伝子は、花序分裂組織においても発現していた (Fig. 13 I). その発現パターンはSAMでのパターンと同様にパッチ様であった。また、花芽分裂組織においても発現していた (Fig. 13 J). 花芽発生ステージ初期での強い発現部位は萼原基に見られた。しかし、ステージの進行に伴い、その部位は、雄しべ、心皮そして胚珠へと移行した (データ示さず)。

*FAS2*遺伝子の発現パターンを調べるために、*in situ* RNAハイブリダイゼーションの実験を試みたが、これまでのところ実験条件が最適化できておらず、解析結果は得られていない。

(c) *FAS*遺伝子のプロモーター近傍にあるシスエレメント

*FAS1*遺伝子の予測翻訳開始点上流500bpの領域には、細胞分裂と関連した発現に関わるとされる複数のシスエレメント; タイプIIエレメント(翻訳開始点を+1としたとき-478の位置にある) (Taoka *et al.*, 1999), サイトII様配列 (-343の位置) (Kosugi *et al.*, 1995), CCGTCC様モチーフ(-259の位置) (Chaubet *et al.*, 1996), ノナマー様配列 (-237の位置) (Nakayama *et al.*, 1992)がある (Fig. 14). タイプIIエレメントはOct配列とTCAの2つのモチーフからなり、多種の植物ヒストン遺伝子のプロモーター上で保存されている (Taoka *et al.*, 1999). また、タイプIIエレメントはタバコ培養細胞BY-2を用いた細胞周期同調化実験系において、S期特異的転写活性化能を持つことが示されている (Taoka *et al.*, 1999). Oct配列のコンセンサス配列はCGCGGATCであるのに対して、*FAS1*遺伝子上のOct配列はtGCGGATgであった。これまでに見いだされているOct配列のアライメント解析において、両端の塩基にはバリエーションが存在することが報告されている (Taoka *et al.*, 1999). こ

れらの知見より、*FAS1*遺伝子上のタイプIIエレメントもそうしたバリエーションの一つで、S期特異的転写活性化能を持つのではないかと考えられた。サイトII配列はイネproliferating cell nuclear antigen (PCNA) 遺伝子の分裂組織特異的発現に必須のエレメントであり、この配列にはbHLHモチーフを持つ核蛋白質のPCF1, PCF2が結合する (Kosugi *et al.*, 1995; Kosugi and Ohashi, 1997). PCFの結合活性において、コンセンサス配列 (GGNCCCAC) と比較して*FAS1*遺伝子上のサイトII様配列 (aGGCCCAC) は約50%の結合能を持つ (小杉俊一博士, 私信). CCGTCC配列やノナマー配列もタイプIIエレメント同様、多種の植物ヒストン遺伝子のプロモーターで保存されており、分裂活性の高い組織においてシス配列として機能していることが*in vivo* footprint実験から示唆されている (Chaubet *et al.*, 1996; Kawata *et al.*, 1988; Nakayama *et al.*, 1992; Bringnon and Chaubet, 1993). 翻訳開始点から500bp内の近傍において、これら細胞分裂に関連した複数のシスエレメントが存在する*FAS1*遺伝子は組織レベルでは分裂活性の高い組織で、さらに細胞レベルでは細胞周期のS期特異的に転写が活性化すると推測される。また、シロイヌナズナのヒストンH3, H4遺伝子にもタイプIIエレメントが、PCNA遺伝子上にはサイトII様配列 (tGGCCCAaあるいはGGCgCCAC) が存在している (Taoka *et al.*, 1999; 田岡健一郎博士 私信). このことから、*FAS1*遺伝子はヒストン遺伝子あるいはPCNA遺伝子と同様の制御下で発現し、発現の時期が類似していることが予想される。

一方、*FAS2*遺伝子の翻訳開始点近傍のプロモーター領域には、*FAS1*遺伝子に存在していたタイプIIエレメントなどのシスエレメントは見られなかった。しかし、予測翻訳開始点上流+1より上流-147bpの位置にE2F結合サイト (TTTCGCG)があった (Kovesdi *et al.*, 1986). 動物細胞において、E2Fは転写因子として細胞周期のG1期からS期への移行や細胞分化に関わり、癌抑制遺伝子のRetinoblastoma (pRB) やpRBファミリーと特異的に結合することも知られている (Helin, 1998; Nevins *et al.*, 1992). 植物細胞においても、pRBホモログ遺伝子が機能すること、E2Fと相同性のある遺伝子がデータベース上で存在している。これらのことは、*FAS2*遺伝子は*FAS1*遺伝子とは異なる制御機構により制御されるが、同じく細胞周期のG1-S期で発現している可能性を示唆している。

(d) プロモーター*GUS*融合遺伝子による発現解析

FAS1, *FAS2*遺伝子のプロモーター制御下でそれぞれ*FAS1* N末端98アミノ酸/*GUS*, *FAS2* N末端36アミノ酸/*GUS*融合蛋白質を発現するように構築したキメラ遺伝子 *pFAS1*(1.0)/*GUS*, *pFAS2*(2.9)/*GUS*を導入し, 形質転換シロイヌナズナを得た. 得られた形質転換体(T2)を用いて, *GUS*組織化学染色によりキメラ遺伝子の発現を調べた. 独立した10株以上の*pFAS1*(1.1)/*GUS*, *pFAS2*(2.9)/*GUS*形質転換体を解析に用いた. ここで用いた *FAS1*遺伝子のプロモーター領域には*FAS1*遺伝子の発現において重要な機能を果たすと考えられるタイプIIエレメント, サイトII様配列を含む, また*FAS2*遺伝子のプロモーター領域は*fas2*突然変異体を相補するのに十分な領域である. SAMにおいて, *FAS1/GUS*遺伝子の発現は*in situ* RNAハイブリダイゼーションの結果と一致し, 発芽3日後の芽生えでは, SAMおよび葉原基で*GUS*の染色が見られた (Fig. 15 A). それらに加えて, 胚軸と根の境界に形成される最初の側根原基, 根端でも染色が見られた (Fig. 15 C, E, G). *pFAS2/GUS*の染色パターンは基本的に*pFAS1/GUS*で観察したものと同一であった (Fig. 15 A-H). この発現パターンの類似性は, *FAS1*, *FAS2*蛋白質が同じ組織で機能していることを示唆し, *FAS1*, *FAS2*蛋白質が*in vitro*において複合体を形成することとよく一致していた. また, このように植物体の中でも特に*GUS*の染色が強く見られたのがSAMやRAMであったことと, *fas*突然変異体で観察した形態的異常の原因がSAMやRAMにあるという推測とは, よく一致していると考えられた.

(e) *FAS*遺伝子の発現と分裂活性および細胞周期

以下の実験において, BY-2の形質転換に用いたベクターの構築は申請者がおこなった. シロイヌナズナ培養細胞における増殖刺激による*FAS*遺伝子の発現解析, ならびにタバコ培養細胞BY-2の形質転換, 形質転換BY-2の細胞周期同調化実験と*pFAS1/GUS*遺伝子の発現解析は田岡健一郎博士 (京都大学大学院理学研究科生物科学専攻植物学系, 現所属 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科) におこなっていただいた.

シロイヌナズナ培養細胞T87を用い, 増殖刺激による*FAS1*, *FAS2*遺伝子の発現量の変動を調べた. 細胞密度が飽和状態にあるシロイヌナズナの培養細胞を新しい培地に希釈し, 増殖刺激を与えた. 植え継ぎ後, 24時間おきに採取した細胞から全RNAを抽出し, RNA ゲルブロット解析により両遺伝子の発現量を調べた. 細胞増殖は, DNA合成活性を指標にモニターした. 細胞増殖と正の相関があるヒストンH4の発現は, 植え継ぎ1日後には, 植え継ぎ前に比べて約3.0倍まで急激に増加した. *FAS1*遺伝子の発現も1日後には約2.0倍まで増加した. *FAS2*遺伝子の発現量の増加率はヒストンH4や*FAS1*遺伝子に比べわずかに低い, 1日後には1.5倍に, 2日後には2.0倍まで発現量が増加した (Fig. 16 A). この結果は, ヒストンH4と同様, *FAS1*, *FAS2*遺伝子の発現と細胞増殖には相関があることを示唆した. さらに, *FAS1*, *FAS2*遺伝子のプロモーターには細胞周期のS期特異的発現に関わるシスエレメントの存在を予測していることから, *FAS1*, *FAS2*遺伝子が細胞周期の特にS期特異的な発現をする可能性が考えられた.

そこで, *FAS1*遺伝子の細胞周期特異的な発現を検証するために, 細胞周期の同調率が高いタバコ培養細胞BY-2を用い, 細胞周期同調化実験をおこなった. シロイヌナズナにおいて*GUS*染色解析に用いたものと同じキメラ遺伝子(*pFAS1*(1.1)/*GUS*)をBY-2に形質導入した. シロイヌナズナのヒストンH4遺伝子H4A748由来のタイプIIエレメントはタバコ培養細胞BY-2においてもS期特異的発現をすることが示されている (Taoka *et al.*, 1999). 形質転換BY-2の細胞周期の同調にはアフィディコリンを用いた. 細胞周期の進行はDNA合成量と分裂指数によりモニターした. アフィディコリン除去後, *FAS1*プロモーターによる*GUS*遺伝子の発現量はRT-PCRにより定量した. コントロールとして, 細胞周期に依存しない発現パターンを示すノパリン合成酵素のプロモーターの制御下で発現する*NPTII*遺伝子を用いた. *GUS*遺伝子の発現量は, アフィディコリン除去から12~14時間後に急激に増大した (Fig. 16 B). この時間帯は, 分裂指数が最大になりM期と考えられる9時間後から, DNA合成活性が再び上昇し2度目のS期開始と考えられる15時間後までの間であることから, G1-S期にあると考えた. このことは, *FAS1*遺伝子のプロモーターはG1-S期に高い転写活性化能を持つことを示唆している.

考 察

1) *hot*突然変異体の表現型における*FAS1*, *FT* 遺伝子の欠損の寄与

*hot*突然変異体は、*FAS1*および*FT*遺伝子に欠損があった。*hot*突然変異体で観察された、本葉の細化、花茎の帯化、萼・花卉の細化、根の伸長遅延は*FAS1*遺伝子の機能欠損、花成遅延は*FT*遺伝子の機能欠損によるものであった。しかし、*hot*突然変異体で見られた表現型の中で2本の主花茎が同時に伸長するという表現型は、*fas1*あるいは*fi*突然変異体のいずれでも見ることはできない。おそらく、*FT*遺伝子の機能欠損により栄養生長期が野生型に比べ長くなり、これに伴い、*FAS*遺伝子の機能欠損がSAMに影響を及ぼす時間が長引いたためだろうと思われる。しかし、この効果は栄養生長期が長くなることが原因と思われるので、*FT*遺伝子特異的ではなく他の花成遅延突然変異体と*fas*突然変異体の二重突然変異体でも同様の表現型が現れるものと考えている。トライコームで見られた異常については、*hot*突然変異体で欠失している遺伝子のなかでどの遺伝子の機能欠損によるものかについて今後調べる必要がある。

2) T-DNA挿入に伴う広範囲のゲノム欠失

*hot*突然変異体ではT-DNA挿入に伴い、75.8kbpのゲノム領域が欠失していた。またT-DNAのRB領域の4.0kbpも欠失していた。T-DNAの両端の配列とゲノム配列とのホモロジーを調べたところ、挿入されたT-DNAのLB側の末端と欠失したゲノム領域の対応する末端の配列間にホモロジーが認められた。これまでに、T-DNA挿入に伴うゲノム領域の欠失については報告されていたが多くは数百塩基対程度までのものであった。

3) *FAS*遺伝子は胚の形態形成には必須でない

*fas*突然変異体において、胚の体制・形態が正常であること、またSAMやRAMもほぼ正常に形成されることから、*FAS*遺伝子は胚の形態形成とSAMやRAMの初期形成には必須でないと考えられる。しかし、*fas*突然変異体のSAMは野生型に比べ平坦になることが

ら (Fig. 4 D), *FAS*遺伝子は胚過程のSAMの維持に関与している可能性が示唆される。

*FAS1*遺伝子の発現が胚発生後期にはSAMに局限されることは (Fig. 13 D), この考えを支持するものと考えられる。

4) *FAS*遺伝子はSAMとRAMの構造と機能の維持に必要である

SAMは後胚発生過程において構造と機能を維持し、CZとPZ領域に区分される機能領域、L1, L2とL3と呼ばれる明瞭な層構造を持つ (Meyerowitz, 1997)。*fas*突然変異体ではこの構造と機能の維持に異常が見られた。例えば、SAMの構造が横に拡がること (Fig. 5 B, D) はCZの機能異常を、本葉がフィラメント状の構造体になることは (Fig. 5 G, H, I) PZの機能異常を、そして層構造の消失 (Fig. 5 B, D) はL1, L2における分裂制御の異常をそれぞれ反映したものであると考えられる。このことは、*FAS*遺伝子がSAMの維持において重要な機能を果たすことを示唆している。*fas*突然変異体以外にSAMの構造制御に関わる遺伝子の突然変態として*CLAVATA (CLV)* 遺伝子の突然変異体が報告されている (Leyser and Furner, 1992; Clark *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1996)。*clv*突然変異体のSAMではCZの細胞分化が抑制されることにより、未分化な細胞の数が増える。その結果SAMが拡がるという表現型を示す (Clark *et al.*, 1995; Laufs *et al.*, 1998)。しかし、*FAS*遺伝子と*CLV*遺伝子は異なる機構によりSAMの構造と機能の維持に関わると考えられた。その理由として、*clv*突然変異体では、*fas*突然変異体で見られるようなL1, L2の細胞層構造には異常がなく、また、発生段階の進行に伴いその異常の程度が変化しないことが挙げられる。*fas1-1; clv1-2*二重突然変異体の表現型解析より、*FAS1*遺伝子と*CLV1*遺伝子に相互作用はないとされている (Leyser and Furner, 1992)。

*fas*突然変異体の胚や若い側根におけるRAMの構造には異常が見られなかったこと (Fig. 4 F, Fig. 12 B) から、*FAS*遺伝子はRAMの形成初期には関与していないと考えた。しかし、*fas*突然変異体の成熟したRAMでは細胞配列の異常やコルメラ細胞の分化制御などの異常 (Fig. 6) や、根の伸長遅延が認められた。このことから、*FAS*遺伝子はQCあるいは各始原細胞の機能制御を通してRAMの構造と機能の維持を担い、さらにそれが正常な根

の伸長とも関連しているかもしれないと考えた。

FAS遺伝子は、SAMあるいはRAMのどちらかの構造と機能の維持に特異的に関わる遺伝子とは異なり、これら両方の構造と機能の維持に共通に必要とされる基本的な制御機構に関与していると考えられた。

5) FAS1, FAS2, AtMSI1蛋白質の機能

FAS1, FAS2蛋白質はそれぞれヒトCAF-1 p150, p60サブユニット、酵母のCac1, Cac2蛋白質との相同性を示した (Fig. 9 B, C). これらに3番目のサブユニットの候補としてAtMSI1蛋白質を加えて、CAF-1としての生化学的機能を持つかどうかについて検討した。FAS1, FAS2そしてAtMSI1蛋白質は*in vitro*において複合体を形成し、さらにこのFAS複合体 (FAS1/FAS2/AtMSI1) には、DNA複製依存的なヌクレオソームアセンブリー活性が認められた (Fig. 10). さらに、FAS1, FAS2両遺伝子はシロイヌナズナにおいて単一コピー遺伝子であることから、FAS1, FAS2およびAtMSI1蛋白質はシロイヌナズナにおいてヒトCAF-1のカウンターパートとして機能していると結論した。

FAS遺伝子はSAMやRAMなど分裂活性の高い組織で発現することに加え (Fig. 15), 増殖活性と対応して発現が上昇する (Fig. 16 A). また、FAS1遺伝子は*in situ* RNA ハイブリダイゼーション実験においてSAM全体で一様に発現するのではなく、パッチ様に発現することを示した。さらに、BY-2の細胞周期同調系を用いた実験 (Fig. 16B)により、FAS1遺伝子は細胞周期のS期に依存した発現をする可能性が示唆された。これらのことは、FAS蛋白質がDNA複製期のヌクレオソーム形成に関与すると考えられることと矛盾しない。

6) *fas*突然変異体でのWUS遺伝子・SCR遺伝子の発現制御

*fas*突然変異体のSAMにおいてWUS遺伝子の、RAMにおいてSCR遺伝子の発現ドメインの維持に異常が見られた。その異所的な発現パターンは、同じアレルでも個体間で大きな変異があり、経時的にその異常の程度が増すと考えられた (Fig.12). また、発現異常の容態も一方向的なものではなく、野生型では発現のない細胞において発現が誘導された

り、発現のある細胞において発現が消失したりする双方向性のものであった。これは、特にRAMにおける*pSCR/GFP*の発現に顕著に見られた。具体的には、たとえ同一アレルの同一個体であっても、RAMごとにそのパターンは異なり、異所的な発現を示すものや、発現が消失したパターンを示すもの、その両方のパターンを示すものなどが観察された。さらにそのパターンは発生段階が進行するに伴い異常の程度が増すことを示唆した。しかし、この異所的な発現や消失は本来の発現ドメインと全く異なる場所で点在して起こるのではなく、同じ内皮・皮層始原細胞に由来する内皮細胞と皮層細胞列、QCと接するコルメラ始原細胞など限定された細胞でのみ起こっていた。このことは、細胞分裂過程において親細胞から娘細胞に引き継がれる遺伝子の発現制御にFAS遺伝子が関与していることを示唆しているかもしれない。さらに、*fas*突然変異体で観られるWUS遺伝子、*pSCR/GFP*の異所的な発現パターンは、*clv*, *shr*突然変異体で見られる様な一定的なものではなく、個体間で変異があった。このことは、FAS遺伝子はCLV遺伝子やSHR遺伝子とは異なる制御経路下で機能していることを示唆した。

7) 後胚発生における形態形成とCAF-1の機能

FAS遺伝子は魚雷型胚期にはすでに発現していた (Fig. 13). さらに培養細胞においてFAS1遺伝子は細胞分裂活性依存的に発現していたこと (Fig. 16)から、受精直後の分裂が始まった胚で、すでに発現が始まっていると推測される。おそらく、CAF-1も胚発生時には機能しているものと考えた。しかし、*fas*突然変異体は胚致死ではなく、胚の形態形成も正常であったことから、CAF-1の機能は胚形成には必須でないと考えられる。出芽酵母のCAF-1ホモログの機能欠損変異体も致死ではない (Kaufman *et al.*, 1997). おそらくCAF-1の機能を代替する蛋白質が存在していると推測できる。その候補としてnucleosome assembly protein 1 (NAP1)やanti-silencing factor (ASF1)が挙げられる。これらは、CAF-1と同様な機能をもつと考えられる蛋白質である。シロイヌナズナでもこれらとホモロジーのある遺伝子がデータベース検索により存在することがわかっている。

一方、胚発生には表現型異常が見られないのに対し、*fas*突然変異体は後胚発生で

は地上部および地下部において多面的な表現型異常を示した。 *fas* 突然変異体では、なぜ胚発生では異常がほとんど現れず、後胚発生で異常が現れるのかについては次のように考えている。シロイヌナズナの胚発生過程では、種子内の胚乳やさらにそれを包む母親由来の組織に囲まれ外界と直接接しない環境下において、受精卵が急速に分裂を繰り返され、胚が形成される。この様な胚発生過程はほとんど個体差なくおこなわれると考えられる。すなわち一定の期間、ある決まった発生プログラムに沿っておこなわれるのが胚発生である。後胚発生過程では、SAMやRAMなどの限定された組織は、日照時間、温度、栄養状況などの環境の応答しながら時間をかけて適切な時期・部位に適切な器官形成をおこなう。すなわち時間をかけて環境に応答した変動性のあるプログラムに沿っておこなわれるのが後胚発生である。CAF-1は、胚発生後のこのような発生プログラムを適切に進行させることにおいて必要なのかもしれない。 *fas* 突然変異体で観られる個体間の表現型の変異は、この発生プログラムを安定に遂行できないことと関連があるのではないかと考えている。

in vitro において、CAF-1はDNA複製時のヌクレオソーム形成に関わることが示されている。このことから、後胚発生過程のこの発生プログラムにおいて、ヌクレオソーム構造が重要な機能を果たしていると考えられた。一方、このことは *in vitro* で明らかにされているヌクレオソーム形成以外にもCAF-1が関与し、機能していることを示唆しているのかもしれない。

8) CAF-1機能欠損による多細胞生物での影響

クロマチン構造と遺伝子の発現制御との関連については近年様々な研究がおこなわれており、またCAF-1についてはこれまでの *in vitro* あるいは酵母の機能欠損変異体を用いた解析よりDNA複製に伴うヌクレオソーム形成において重要な因子であると考えられている (Verreault, 2000)。 *fas* 突然変異体は多細胞生物においてCAF-1の機能が欠損した突然変異体として最初の報告であり、CAF-1が発生や形態形成においても重要な機能を果たしていることを示した初めての報告でもある。今後、CAF-1によるクロマチン構造と発生や形態

形成との関連、あるいはヌクレオソーム形成以外のCAF-1の新たな機能など、生体内におけるCAF-1の機能について理解を深めるために *fas* 突然変異体をは有益な手がかりを与える と期待する。

9) *fas* 突然変異体の解析から推測できるCAF-1の機能

ヒトCAF-1は、DNA複製期のヌクレオソーム形成に関わる因子として同定された (Smith and Stillman, 1989)。酵母CAF-1機能欠損変異体では、細胞増殖課程においてテロメア領域あるいは *HM* 遺伝子座の遺伝子発現の抑制状態を安定に維持できないことが報告されている (Kaufman et al., 1997; Enomoto et al., 1997; Monson et al., 1997; Kaufman et al., 1998; Enomoto and Berman, 1998)。これららの結果から、CAF-1はDNA複製の前後で遺伝子の発現状態を安定的に維持するメカニズムに寄与する可能性が示唆されている。そのメカニズムの一つの候補としてエピジェネティック情報の維持が考えられている (Ridgway and Almouzni, 2000)。 *fas* 突然変異体のSAMとRAMで観察された *WUS* 遺伝子、*SCR* 遺伝子の発現異常は、細胞分裂時のヌクレオソームの形成過程をとおしてクロマチン状態を安定に制御できないことが原因であるという可能性が考えられた。DNA複製期には、クロマチン構造がいったん解離する。複製直後のDNAはヌクレアーゼに対する感受性が高いことから、裸の状態にあると考えられている (Smith et al., 1984)。複製後、CAF-1はヒストンをDNA上に速やかにリクルートしヌクレオソームを再形成する。このことにより、核の様々な転写因子が無秩序に裸のDNAと結合することを防ぐことができると考えられた。 *fas* 突然変異体ではCAF-1の機能が欠損しているために、この速やかなヌクレオソーム形成ができずに、裸のDNAに転写因子が結合し、その結果、あるときには発現が促進、あるときは抑制されたりとゆらぎが生じるのではないかと考えられた。 *fas* 突然変異体で見られた表現型の変異、 *WUS* 遺伝子、*SCR* 遺伝子の発現異常の変異は、ヌクレオソームの形成時のこのゆらぎが原因かもしれないと考えている。別の可能性として、CAF-1が転写因子あるいはシグナル伝達において機能し、 *WUS* 遺伝子、あるいは *SCR* 遺伝子の発現を制御していることが考えられた。シグナルペプチドをコードする *CLV3* 遺伝子の突然変異体では、 *WUS* 遺伝子の

発現が広がる (Schoof *et al.*, 2000). しかし, その異常のパターンは横方向に広がるのみで, 個体間での変異 (ゆらぎ) は認められない. これらのことから推測して, この可能性は低いと考えられる.

マウスのCAF-1はheterochromatin proteins (HP-1)と結合する (Murzina *et al.*, 1999). このことは, CAF-1はヘテロクロマチン形成に関わる蛋白質をDNA上にリクルートすることで, クロマチン構造による発現制御の遺伝的維持に関わることを示唆するものである (Murzina *et al.*, 1999). *fas*突然変異体においても, *WUS*遺伝子, *SCR*遺伝子の発現異常だけでなく, ヘテロクロマチンにある遺伝子の発現抑制に異常が起こっている可能性が考えられる.

10) 今後の課題と展望

(a) *in situ* RNAハイブリダイゼーションによる*FAS1*, *FAS2*遺伝子の発現解析

*FAS1*遺伝子は分裂活性のある組織では発現している可能性は非常に高い. 葉の鋸歯の形成には, 平面分裂組織 (plate meristem) が重要であるとされている. *fas*突然変異体でも葉の形態に異常示すことから, これらの組織でも発現していることが推測できる. 同様のことは, 葉以外の側生器官の形態においても考えられる. 植物体のSAMやRAM以外の組織のどの細胞で*FAS1*遺伝子を発現しているのかを詳細に解析することで, 形態形成における*FAS*遺伝子の機能を明らかにできるものと考えている.

*FAS2*遺伝子の*in situ* RNAハイブリダイゼーションによる発現パターンは, 明らかでない. *in vitro*において*FAS1*, *FAS2*蛋白質は複合体を形成しているが, 細胞レベルで*FAS1*遺伝子と*FAS2*遺伝子が同一の細胞で発現しているのかどうかについても明らかにする必要があると考えられる. *FAS2*遺伝子の発現が, *FAS1*遺伝子を発現している細胞以外でも観察されたなら, 一つの可能性として*FAS2*蛋白質は*FAS1*蛋白質以外のものと相互作用し, CAF-1以外の活性に関与していることが考えられる.

(b) 胚での*WUS*遺伝子の発現解析

後胚発生期のSAMでは*WUS*遺伝子の異所的な発現と消失が見られたことから, *FAS*遺伝子は*WUS*遺伝子の発現制御に関わる可能性が示唆された. *WUS*遺伝子は胚発生の16細胞期から発現を始める (Mayer *et al.*, 1998)が, *fas*突然変異体の胚の形態は正常である. *FAS*遺伝子がどのようなメカニズムで*WUS*遺伝子の発現に関わるのか, *fas*突然変異体の胚がなぜ正常なのかを推測するためにも, *fas*突然変異体の胚での*WUS*遺伝子の発現を調べることが必要であると考えられる.

(c) *in situ* RNAハイブリダイゼーションによる*CLV3*遺伝子の発現解析

*CLV3*遺伝子はSAMのCZにある幹細胞とされる細胞で発現する (Fletcher *et al.*, 1999). また, *CLV3*遺伝子は*WUS*遺伝子とのフィードバックループを形成することで, 両発現ドメインが維持されている (Schoof *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2000). *fas*突然変異体では*WUS*遺伝子の発現が拡大していた. *fas*突然変異体での*CLV3*遺伝子の発現を調べることで, *fas*突然変異体のSAMでは幹細胞の数が変動しているのか, *FAS*遺伝子がこのフィードバックループの発現制御においてどのように関与しているのかなどについて推測する手がかりが得られる.

(d) *SHR*遺伝子の発現解析

*SHR*遺伝子は*SCR*遺伝子の上流で, 細胞非自律的に機能していることが示唆されている (Helariutta *et al.*, 2000). *fas*突然変異体では, *SCR*遺伝子の異所的な発現と消失を示した. そこで, *fas*突然変異体での*SHR*遺伝子の発現を調べることで, *SCR*遺伝子の発現異常の原因が推測されるものと考えられる. 具体的には, 2種類のGFP (紫外光で励起するGFPと青色光で励起するGFP) を*SCR*遺伝子あるいは*SHR*遺伝子のプロモーターの下流に繋いだキメラ遺伝子の発現を*fas*突然変異体で観察する. *SHR*遺伝子の発現が正常であるにも関わらず*SCR*遺伝子の異所的発現が見られるような結果が得られたときは, *SCR*遺伝子の発現がCAF-1により直接制御されている可能性が考えられる. さらにそれは, *SCR*遺伝

子領域のクロマチン構造の変化と関連があるかもしれない。

(e) 長期課題と展望

CAF-1は、ヌクレオソーム形成だけでなく、DNA修復時においても機能するとされている (Gaillard *et al.*, 1996). 酵母の*cac*突然変異体では、紫外線に対する感受性が増大する (Kaufman *et al.*, 1997; Game and Kaufman *et al.*, 1999). 予備的な実験において、*fas*突然変異体もDNAに損傷を与える薬剤のmethyl methanesulfonate (MMS)に対して感受性が増す (Jerzy Paszkowski博士, 私信). *fas*突然変異体を用いた解析より、高等生物のDNA除去修復におけるCAF-1の機能について明らかになることが期待される。

また、今回解析しなかった*fas1*, *fas2*突然変異体以外の*fas*突然変異体は、CAF-1の3つめのサブユニットであるAtMSI, あるいはCAF-1と同様の機能をもつと考えられているNAP1, ASF, PCNAなどをコードする遺伝子, あるいはCAF-1と相互作用する蛋白質をコードする遺伝子に欠損がある可能性がある。今後、これらの*fas*突然変異体を解析することは、エピジェネティックな遺伝子発現制御の興味深い現象を明らかにする手がかりになると期待している。

謝 辞

本研究は、京都大学大学院理学研究科生物科学専攻植物学系遺伝情報制御学分野の飯 哲夫博士（京都大学大学院理学研究科 助教授）、岩渕雅樹博士（京都大学大学院理学研究科 元教授；現所属 岡山県生物総合科学研究所）、荒木 崇博士（京都大学大学院理学研究科 助手）のご指導を頂いておこなわれました。深く感謝申し上げます。本研究をおこなうにあたり、荒木 崇博士には熱心なご指導と、厳しくも暖かい叱咤激励を頂きましたこと、心よりお礼申し上げます。研究活動において、私はまだまだ至らないところばかりですが、多くのことを学ばせていただきました。

共同研究者の柴原慶一博士（Cold Spring Harbor Laboratory；現所属 科学技術振興事業団 若手研究者研究推進事業）、田岡健一郎博士（京都大学大学院理学研究科；現所属 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科）にお礼申し上げます。小杉俊一博士（理化学研究所）、Jerzy Paszkowski 博士(Friedrich Miescher Institute)には、未発表データを提供していただきました。深城英弘博士、Philip N. Benfey博士（Department of Biology, New York University）より*pSCR/GFP*の種子を分与して頂きました。佐藤修正博士、田畑哲之博士（かずさDNA研究所）には塩基配列を決めていただきました。相田光宏博士、田坂昌生博士（奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科）には、*in situ* RNAハイブリダイゼーションの方法を教えてくださいました。小山時隆博士、石黒澄衛博士、岡田清孝博士（京都大学大学院理学研究科）には、TAIL-PCRの方法を教えてください、ゲノムDNAライブラリーを分与して頂きました。深くお礼申し上げます。

また、西村いくこ博士（京都大学大学院理学研究科 教授）、嶋田知生博士（京都大学大学院理学研究科 助手）には、現研究室において支障なく研究活動ができるようにお取り計らい頂きましたこと、お礼申し上げます。京都大学大学院理学研究科生物科学専攻植物学系を卒業された先輩方、現在所属しているみなさまには、研究活動、院生生活の様々な面でお世話になりましたこと、お礼申し上げます。また、植物学系事務の方々には、手続きや植物学系のイベントの際には何かとお世話いただきましたこと、お礼申し上げます。

最後に、6年の博士課程において、経済的援助と励ましをいただいた私の家族と、いつも私を支えてくれた妻の千佐子に感謝します。

引用文献

- Ach, R. A., Taranto, P. and Gruissem, W.** (1997). A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals. *Plant Cell* **9**, 1595-1606.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M.** (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**, 841-57.
- Azpiroz-Leehan, R. and Feldmann, K. A.** (1997). T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth. *Trends Genet* **13**, 152-156.
- Barton, M. K. and Poething, R. S.** (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development* **119**, 823-831.
- Benfey, P. N., Linstead, P. J., Roberts, K., Schiefelbein, J. W., Hauser, M. T. and Aeschbacher, R. A.** (1993). Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* **119**, 57-70.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. and Benning, C.** (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *Embo J* **17**, 170-180.
- Braissant, O. and Wahli, W.** (1998). A simplified in situ hybridisation protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNA on tissue sections. *Biochemica* **1**, 10-16.
- Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M. and Simon, R.** (2000). Dependence of Stem Cell Fate in Arabidopsis on a Feedback Loop Regulated by CLV3 Activity. *Science* **289**, 617-619.
- Brignon, P. and Chaubet, N.** (1993). Constitutive and cell-division-inducible protein-DNA interactions in two maize histone gene promoters. *Plant J* **4**, 445-457.
- Bulger, M., Ito, T., Kamakaka, T. T. and Kadonana, J. T.** (1995). Assembly of regularly spaced nucleosome arrays by *Drosophila* chromatin assembly factor 1 and a 56-kDa histone-binding protein. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11726-11730.

Chaubet, N., Flenet, M., Clement, B., Brignon, P. and Gigot, C. (1996). Identification of cis-elements regulating the expression of an Arabidopsis histone H4 gene. *Plant J* **10**, 425-435.

Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z. and Meyerowitz, E. M. (1996). The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in Arabidopsis. *Development* **122**, 1567-1575.

Clark, S. E., Running, M. P. and Meyerowitz, E. M. (1993). *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* **119**, 397-418.

Clark, S. E., Running, M. P. and Meyerowitz, E. M. (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* **121**, 2057-2067.

Clark, S. E., Williams, R. W. and Meyerowitz, E. M. (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.

Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A. and Benfey, P. N. (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* **86**, 423-433.

Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. and Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**, 71-84.

Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z. and Laux, T. (1996). The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J* **10**, 967-979.

Enomoto, S. and Berman, J. (1998). Chromatin assembly factor I contributes to the maintenance, but not the re-establishment, of silencing at the yeast silent mating loci. *Genes & Development* **12**, 219-232.

Enomoto, S., McCune-Zierath, P. D., Gerami-Nejad, M., Sanders, M. A. and Berman, J. (1997). *RLF2*, a subunit of yeast chromatin assembly factor-I, is required for telomeric chromatin function in vivo. *Genes & Development* **11**, 358-370.

- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. and Meyerowitz, E. M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems [see comments]. *Science* **283**, 1911-1914.
- Fukaki, H., Wysocka-Diller, J. W., Kato, T., Fujisawa, H., Benfey, P. N. and Tasaka, M.** (1998). Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**, 425-430.
- Gaillard, P. H., Martini, E. M., Kaufman, P. D., Stillman, B., Moustacchi, E. and Almouzni, G.** (1996). Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* **86**, 887-896.
- Game, J. C. and Kaufman, P. D.** (1999). Role of *Saccharomyces cerevisiae* chromatin assembly factor-I in repair of ultraviolet radiation damage in vivo. *Genetics* **151**, 485-497.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M. T. and Benfey, P. N.** (2000). The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* **101**, 555-567.
- Helin, K.** (1998). Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 28-35.
- Huh, G. H., Nakayama, T., Meshi, T. and Iwabuchi, M.** (1997). Structural characteristics of two wheat histone H2A genes encoding distinct types of variants and functional differences in their promoter activity. *Plant Mol Biol* **33**, 791-802.
- Jefferson, A. B. and Majerus, P. W.** (1995). Properties of type II inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem* **270**, 9370-9377.
- Jeong, S., Trotochaud, A. E. and Clark, S. E.** (1999). The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-1934.
- Jonsson, Z. O. and Hubscher, U.** (1997). Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays* **19**, 967-975.
- Kaufman, P. D., Cohen, J. L. and Osley, M. A.** (1998). Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I. *Mol Cell Biol* **18**, 4793-4806.

- Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N. and Stillman, B.** (1995). The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* **81**, 1105-1114.
- Kaufman, P. D., Kobayashi, R. and Stillman, B.** (1997). Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes & Dev.* **11**, 345-357.
- Kawata, T., Nakayama, T., Mikami, K., Tabata, T., Takase, H. and Iwabuchi, M.** (1988). DNA-binding protein(s) interacts with a conserved nonameric sequence in the upstream regions of wheat histone genes. *FEBS Lett* **239**, 319-323.
- Keddie, J. S., Carroll, B. J., Thomas, C. M., Reyes, M. E., Klimyuk, V., Holtan, H., Gruissem, W. and Jones, J. D.** (1998). Transposon tagging of the Defective embryo and meristems gene of tomato. *Plant Cell* **10**, 877-888.
- Kenziar, A. L. and Folk, W. R.** (1998). AtMSI4 and RbAp48 WD-40 repeat proteins bind metal ions. *FEBS Lett* **440**, 425-429.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. and Araki, T.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**, 1960-1962.
- Koornneef, M., Hanhart, C. J. and van der Veen, J. H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **229**, 57-66.
- Kosugi, S. and Ohashi, Y.** (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* **9**, 1607-1619.
- Kosugi, S., Suzuka, I. and Ohashi, Y.** (1995). Two of three promoter elements identified in a rice gene for proliferating cell nuclear antigen are essential for meristematic tissue-specific expression. *Plant J* **7**, 877-886.
- Kovesdi, I., Reichel, R. and Nevins, J. R.** (1986). E1A transcription induction: enhanced binding of a factor to upstream promoter sequences. *Science* **231**, 719-722.
- Krude, T.** (1995). Chromatin assembly factor 1 (CAF-1) colocalizes with replication foci in HeLa cell nuclei. *Exp. Cell Res.* **220**, 304-311.
- Laufs, P., Grandjean, O., Jonak, C., Kiêu, K. and Traas, J.** (1998). Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1375-1389.

Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J. and Jürgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**, 87-96.

Leyser, H. M. O. and Furner, I. J. (1992). Characterization of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **116**, 397-403.

Liu, Y. G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and Whittier, R. F. (1995). Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* **8**, 457-63.

Long, J. A. and Barton, M. K. (1998). The development of apical embryonic pattern in Arabidopsis. *Development* **125**, 3027-3035.

Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I. and Barton, M. K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* **379**, 66-69.

Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. and Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.

McBride, K. E. and Summerfelt, K. R. (1990). Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **14**, 269-276.

McConnell, J. R. and Barton, M. K. (1998). Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. *Development* **125**, 2935-2942.

Meyerowitz, E. M. (1997). Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* **88**, 299-308.

Monson, E. K., De Bruin, D. and Zakian, V. A. (1997). The yeast Cac1 protein is required for the stable inheritance of transcriptionally repressed chromatin at telomeres. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13081-13086.

Murzina, N., Verreault, A., Laue, E. and Stillman, B. (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell* **4**, 529-540.

Nakayama, T., Sakamoto, A., Yang, P., Minami, M., Fujimoto, Y., Ito, T. and Iwabuchi, M. (1992). Highly conserved hexamer, octamer and nonamer motifs are positive cis-regulatory elements of the wheat histone H3 gene. *FEBS Lett* **300**, 167-170.

Nevins, J. R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**, 424-429.

O'Dowd, B. F., Quan, F., Willard, H. F., Lamhonwah, A. M., Korneluk, R. G., Lowden, J. A., Gravel, R. A. and Mahuran, D. J. (1985). Isolation of cDNA clones coding for the beta subunit of human beta-hexosaminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1184-1188.

Orlando, V. and Paro, R. (1995). Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 174-179.

Pysh, L. D., Wysocka-Diller, J. W., Camilleri, C., Bouchez, D. and Benfey, P. N. (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* **18**, 111-119.

Reinholz, E. (1966). Radiation induced mutants showing changed inflorescence characteristics. *Arab. Inf. Serv.* **3**, 19-20.

Ridgway, P. and Almouzni, G. (2000). CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair. *J Cell Sci* **113**, 2647-2658.

Ruggieri, R., Tanaka, K., Nakafuku, M., Kaziro, Y., Toh-e, A. and Matsumoto, K. (1989). MSI1, a negative regulator of the RAS-cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8778-8782.

Running, M. P., Clark, S. e. and Meyerowitz, E. M. (1995). Confocal microscopy of the shoot apex. In *Methods in Plant Cell Biology, Part A*, eds D. W. Galbraith H. J. Bohnert and D. P. Bourque), pp. 217-229. San Diego: Academic Press.

Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.-T., Janmaat, K., Weisbeek, P. and Benfey, P. N. (1995). Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**, 53-62.

Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F., Jurgens, G. and Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**, 635-644.

Schultes, N. P., Brutnell, T. P., Allen, A., Dellaporta, S. L., Nelson, T. and Chen, J. (1996). Leaf permease1 gene of maize is required for chloroplast development. *Plant Cell* **8**, 463-475.

Shibahara, K., Verrault, A., and Stillman, B. (2000). The N-terminal domains of histones H3 and H4 are not necessary for chromatin assembly factor 1-mediated nucleosome assembly onto replicated DNA *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* in press.

Shibahara, K. and Stillman, B. (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* **96**, 575-585.

Smith, C. A. and Okumoto, D. S. (1984). Nature of DNA repair synthesis resistant to inhibitors of polymerase alpha in human cells. *Biochemistry* **23**, 1383-1391.

Smith, S. and Stillman, B. (1989). Purification and characterization of CAF-1, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication *in vitro*. *Cell* **58**, 15-25.

Steeves, T. A. and Sussex, I. M. (1989). Patterns in Plant Development. Cambridge: Cambridge University Press.

Taoka, K., Kaya, H., Nakayama, T., Araki, T., Meshi, T. and Iwabuchi, M. (1999). Identification of three kinds of mutually related composite elements conferring S phase-specific transcriptional activation. *Plant J* **18**, 611-623.

Tinland, B. (1996). The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Science* **1**, 178-184.

Trotochaud, A. E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z. and Clark, S. E. (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein [see comments]. *Plant Cell* **11**, 393-406.

Trotochaud, A. E., Jeong, S. and Clark, S. E. (2000). CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science* **289**, 613-617.

van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P. and Scheres, B. (1995). Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signalling [see comments]. *Nature* **378**, 62-65.

van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P. and Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* **390**, 287-289.

Verreault, A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev* **14**, 1430-1438.

Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* **87**, 95-104.

Waga, S. and Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **67**, 721-751.

Wysocka-Diller, J. W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J. E. and Benfey, P. N. (2000). Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* **127**, 595-603.

Zhang, Z., Shibahara, K. and Stillman, B. (2000). PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast [In Process Citation]. *Nature* **408**, 221-225.

Zou, C., Zhang, Z., Wu, S. and Osterman, J. C. (1998). Molecular cloning and characterization of a rabbit eIF2C protein. *Gene* **211**, 187-194.

荒木 崇, 賀屋秀隆(2000).タギング法-シロイヌナズナ.「モデル植物ラボマニュアル」(編者 岩淵雅樹, 岡田清孝, 島本功), シュプリンガー・フェアラーク東京, pp162-168.

図表説明

Fig. 1 *hot*突然変異体の栄養生長期の表現型

- (A) 3日目の芽生え. 野生型(左), *hot*突然変異体(右). 1%ショ糖を含むMS培地で育てた. スケール 1 mm.
- (B, C) 子葉の間に出現した本葉. 野生型(B)ではトライコームを持つ本葉が使用の間に出現していたが, *hot*突然変異体(C)ではまだ本葉が出現していない. 生育が遅い. スケール 1 mm.
- (D) 7日目の根の長さ. 野生型(左の4株), *hot*突然変異体(右の4株) 1%ショ糖, 1.5%寒天を含み垂直にしたMS培地で育てた. スケール 5 mm.
- (E, F) 8日目の芽生えの子葉と, 第一, 第二, 第三, 第四本葉. 野生型(E), *hot*突然変異体(F). 子葉と第一, 第二本葉は十分に展開している. スケール 2 mm.
- (G, H) 10日目の野生型(G), *hot*突然変異体(H). *hot*突然変異体では, 根が表面を這うものが多く見られた. 1%ショ糖を含むMS培地で育てた. スケール 2 mm.
- (I, J) 第6番目の本葉. 野生型(I), *hot*突然変異体(J) スケール 1 mm.
- (K, L) 主根の根端. 野生型(K), *hot*突然変異体(L) スケール 0.5 mm.

Fig. 2 芽生えの器官, 花弁と萼のサイズとトライコームの枝数

- (A) 8日目の胚軸(Hy)と根(Ro)の長さ(mm). (n=36)
- (B) 3週間目の子葉(Cot)と第一(1st Le), 第二本葉(2nd Le)の長さ(L), 幅(W) (mm). (n=23)
- (C) 本葉(芽生え第4～第6本葉)のトライコームの枝の数. 野生型(n=1241), *hot*突然変異体(n=346)
- (D) 萼と花弁の長さ(L), 幅(W) (mm). (n=23の花)
- 野生型は白棒, *hot*突然変異体は黒棒.

Fig. 3 *hot*突然変異体の生殖生長期の表現型

- (A, B) 明条件下の2ヶ月目の*hot*突然変異体. 花茎が伸び始めた個体もある(B). ポットの直径は7 cm.
- (C, D) (A)の植物の茎頂部の拡大. 両植物とも花茎が拡大, 主花茎が2つ見える. スケールは, 5 mm(C), 2 mm(D).
- (E) *hot*突然変異体の帯化した花茎. スケール 1 cm.

(F)(E)の花茎の先端部の拡大. スケール 5 mm.

(G) (E)の花の拡大. スケール 2 mm

(H) 花の形態. 野生型(左), *hot*突然変異体(右) スケール 1 mm.

(I)(H)の花の萼と花弁. 花弁(上), 萼(下), 野生型(左), *hot*突然変異体(右), スケール 1 mm.

(J, K) *hot*突然変異体の花茎に出現した二次ロゼット. (J) スケール 1 cm. (K) スケール 2 mm.

Fig. 4 *fas*突然変異体の胚

(A, B) 成熟胚の全体像. 野生型 En(A), *fas1-1*(B).

(C, D) 成熟胚のSAMの拡大. 野生型 En(C), *fas1-1*(D).

(E, F) 成熟胚のRAMの拡大. 野生型 En(E), *fas1-1*(F).

共焦点レーザー顕微鏡による検鏡. スケール 100 μ m (A, B), 50 μ m (C-F).

Fig. 5 *fas*突然変異体の茎頂部とSAMの表現型

(A-F) 栄養生長期のSAM

7日目の野生型En(A), 7日の*fas1-1*(B), 10日目の野生型N(C), 10日目の*fas2-2*(D), 9日目の*fas1-2*(E), 11日目の*fas1-1;fas2-2*(F), 野生型(A,C)では, L1, L2, L3の層構造が鮮明である. *fas*突然変異体(B, D, E, F)では層構造に異常があり, 横方向に広がっている. 特に*fas1-2*(E)ではSAMが縦方向に広がり, 構造が崩壊している. 矢じりは子葉とSAMの境界を示している. スケール 50 μ m.

(C)の黄色い領域はCZ, 緑の領域はPZを, 黒いラインは最外層から順にL1, L2, L3の層構造を示している.

(G-I) 真上からの茎頂部.

9日目の*fas1-2*(G), 9日目の*fas2-2*(H), 14日目の*fas2-2*(I). 本葉の位置にフィラメント状の構造体が現れる. スケール 0.5 mm.

野生型En(J), *fas1-1*(K), 野生型No (L), *fas2-2*(M), *fas1-1;fas2-2*(N) で花茎の帯化が見られる.

Fig. 6 *fas*突然変異体の根端とRAMの表現型

(A-D) 10日目の主根の根端

野生型 En (A), *fas1-1*(B), 野生型 Ler(C), *fas2-1*(D). 矢じりは確認できる最下位の根毛とRAMを示している. *fas*突然変異体ではこの間が狭い. スケール 0.5 mm

(E-J) 6日目のRAMと伸長領域の一部, 共焦点レーザー顕微鏡像, 赤いのはPI染色
 野生型 En(E), *fas1-1*(F), *fas2-2*(G), *fas1-1;fas2-2* (H), (E)と(F)のそれぞれQCと始原細胞
 の領域を拡大(I), (K). (F), (G), (J)では皮層や内皮にサイズが大きく, 分化している可
 能性のある細胞が見られ, コルメラ付近の細胞構造が異常. スケール 50 μ m .
 (K) 野生型RAMの模式図, 中心の白はQC, その周囲の濃い色は各始原細胞, 斑点模様は
 分化した各種細胞を示す.
 (L-R)6日目の主根のデンプン顆粒染色
 野生型 En(L), *fas1-1*(M), 野生型 No(N), *fas2-2* (O), *fas1-1;fas2-2*(R), (L)と(M)のそれぞ
 れQCと始原細胞の領域を拡大(P), (Q).
 (L)と(N)の矢印はコルメラ始原細胞を, 矢頭はQCを示している. (M), (O), (Q), (R)の矢
 印は細胞列より推測されるコルメラ始原細胞あるいはQCの位置.
 (P)の*はQC細胞を, +はコルメラ始原細胞を示している. スケール 50 μ m.

Fig. 7 *FAS1-FT*欠失領域と*FAS1*遺伝子の構造

(A) 形質導入に用いたT-DNAと*hot*突然変異体の第一染色体におけるDNA構造
 (B) *hot*突然変異体の*FAS1-FT*欠失領域に予測されている遺伝子. 下線は*hot*突然変異体の
 欠失領域を示している. 白BOXは予測ORFを示している. 白BOXの上部の矢印は予想され
 る転写方向を示している.
 (C) *FAS1*遺伝子の構造. 黒BOXはエクソンを示している. 三角旗印は予測翻訳開始点を四
 角旗印は翻訳終結点をそれぞれ示している. 点線BOXは未確定転写領域. 下線は, *hot*突
 然変異体で欠失している領域を示している. 2つの向き合った矢印(*FAS1* RT-1, *FAS1*RT-
 2)は発現解析に用いたプライマーの位置を示している.
 (D) *FAS1*遺伝子由来のESTクローン106J1(DDBJ/EMBL/GenBank accession number:
 AB027228)
 (E) BACクロンの*FAS1*遺伝子領域の上に予測された2つのORF. 黒BOXはエクソンを示
 している. 三角旗印は予測翻訳開始点を四角旗印は翻訳終結点をそれぞれ示している.
 (F)*FAS1*遺伝子領域のBACクローンF5I14, T8F5の連結構造.
 (C)-(E)は同一スケールで示した.

Fig. 8 *hot*突然変異体でのT-DNAと植物ゲノムの連結部

*hot*突然変異体のT-DNA配列とゲノム配列の連結領域と野生型ゲノム配列との比較. T-
 DNAの右側配列が上, LB領域配が下. *hot*突然変異体の欠失領域(F5I14, 2151-78028).

T-DNA配列と野生型ゲノム配列とで一致する塩基を*で示した. 右側T-DNA(NOS
 terminator配列内)の重複は矢印で示した. LB配列はBoxで示した.

Fig. 9 *FAS1*, *FAS2*蛋白質のアミノ酸配列

(A) *FAS1*アミノ酸配列. KERドメインは下線で, ED領域はBOXで示している. (*)は変異
 位置を示している. *fas1-1*(TGG->TGA stop), *fas1-2*(CAA->TAA stop).
 (B) *FAS1*, p150, *Cac1p*蛋白質の構造比較. 各比率(%)はKERドメイン, KD領域それぞ
 れにおけるアミノ酸の同一性(類似性)を示している.
 (C) *FAS2*アミノ酸配列. 7箇所のWD-40は下線で示している. (*)は変異位置を示してい
 る. *fas2-1*(TGG->TGA stop). 矢印は*fas2-2*での読み枠がずれ始めた位置を示している.
 (D) *FAS2*, p60, *Cac2p*蛋白質の構造比較. 各比率(%)は7回繰り返しのWD-40領域でのアミ
 ノ酸の同一性(類似性)を示している.
 (E)*fas2-2*のmRNA

*fas2-2*の第3エクソン直前にあるアクセプターサイトでG->Aの塩基置換が起こっている
 (太字). スプライスサイトが1bpずれ, *FAS2*のmRNAが1bp欠失している. 矢じりはスプラ
 イス位置を示している. 正常なアミノ酸は標準で, 誤ったアミノ酸は太字で, アミノ酸の
 下の数字は予測開始アミノ酸からの位置を示している. *fas2-2*の*FAS2*蛋白質は76番以降,
 野生型と異なる88個のアミノ酸を付加した後, 終結する.

Fig. 10 *FAS*複合体とヌクレオソームアセンブリー活性, マイクロコッカルヌクレアーゼ
 消化

(A) *FAS*複合体形成
³⁵Sメチオニンでラベルした*FAS1*, His-*FAS2*, AtMSI1蛋白質は*in vitro*転写・翻訳システム
 で合成した. 3つの翻訳産物をそれぞれ含むウサギ網状赤血球ライセートを混合し, さら
 にアガロースビーズ(lane2)あるいはNi-NTAビーズ(lane3)を加えた後, 4℃に保った. 2時間
 後, ビーズを沈殿させ, その沈殿物をPAGEで分画した. 2.5%のinputを同時に泳動した
 (lane1).
³⁵Sメチオニンでラベルした*FAS1*あるいはAtMSI1を合成し, 単独にNi-NTAビーズを加えた
 後, 同じく沈殿させ, PAGEで分画した(lane 5, lane7). 2.5%のinputを同時に泳動した
 (lane4, 6)
 His-*FAS2*依存的に*FAS1*, AtMSI1がNi-NTAビーズと共沈した.
 (B) *FAS*複合体のDNA複製に依存したヌクレオソーム形成

スピンカラム精製した新規に複製されたDNAに対するヌクレオソームアセンブリー活性は、FAS1, FAS2, AtMSI1を含むウサギ網状赤血球ライセートにS100抽出液を加えておこなった。S100抽出液あるいはヒトCAF-1の存在, 非存在は+, -で示した。x3はx1の3倍量の赤血球溶解物を加えたことを示している。各翻訳産物を含む赤血球ライセートは、4°Cにおいて各組み合わせで混合し、複合体を形成させておいた。lane3, 5, 7, 9あるいはlane4, 6, 8, 10で加えた赤血球ライセートの量は一律にした。I, Io/IIはそれぞれform I, Io, II形成のDNAを示している。上のパネルはオートラジオグラフで、³²PラベルされたDNA(新規に合成させたDNA)の移動度を示している。下のパネルはエチジウム染色で、DNA(全体のDNA)の移動度を示している。

ヒトCAF-1とx3FAS1/FAS2/AtMSI1複合体を加えたとき、³²PラベルされたDNAでのみform I DNAが検出された。

(C)マイクロコッカルヌクレアーゼ消化

(B)において形成させた³²Pラベルform I DNAをマイクロコッカルヌクレアーゼで10, 30分間消化した。消化後、PAGEで分画した。AtCAF-1(FAS1/FAS2/AtMSI1)により形成されたform I DNAにおいて、ヒトCAF-1と同様、-mono, -di ヌクレオソームが検出された。

Fig. 11 WUS遺伝子の発現解析

(A-F)in situ RNA hybridizationによる5日目芽生えのSAMでのWUS mRNAの蓄積パターン。野生型 En(A), *fas1-1*(B-D), 野生型 No(E), *fas2-2*(F)。(B-D)の3つは同じSAM由来の切片。WUSの発現ドメインが、SAMの左端から右端まで広がっている。(F)の矢じりではL1における蓄積を示している。また、矢印では葉原基の形成が始まっていると考えられる。

Fig. 12 *pSCR/GFP*の発現解析

(A-L) 共焦点レーザー顕微鏡による根端部における*pSCR/GFP*由来のGFPの蛍光パターン。野生型 (A), *fas1-1*(B-L)。(B)は若い側根(コルメラ細胞の細胞層・細胞数が少ない)。野生型によく似た蛍光パターンを示す。(I, J, K)の大きな矢じりは皮層となる細胞での胃所的蛍光, 小さな矢じりはコルメラ始原細胞および1列目のコルメラ細胞での異所的蛍光を示している。(J)の矢印は蛍光が消失した内皮・皮層始原細胞を示している。(L)の矢印は蛍光が消失した内皮細胞群を示している。(M-O), (P-Q)はそれぞれ同一のRAM由来の切片。矢印は蛍光が消失したQC, 内皮・皮層

始原細胞を示している。

Fig. 13 *FAS1* in situ RNA ハイブリダイゼーション

(A-E) 胚発生での*FAS1* mRNAの蓄積パターン。

(A) 魚雷型胚。胚全体でパッチ様の発現パターンを示す。

(B, C) ベンディングが始まった胚。(B)と(C)の切断面は直交する。(B)の矢頭はSAMの構造が形成される予定領域(まだドーム構造が見られない)での*FAS1*遺伝子の発現を示している。

(C) SAMのドーム構造が現れ始める。

(D) ベンディングコチレドン期の胚。*FAS1*遺伝子の発現はSAMにだけ見られる。

(E) 乾燥期の胚。*FAS1*遺伝子の発現は消失する。

(F-H) 3日目芽生えのSAMでの*FAS1* mRNAの蓄積パターン。

(F, G) 野生型。(F)はSAMの正中面,(G)はSAMの正中面をはずれた面, 葉原基の細胞隆起が見られる。

(H)*hot*突然変異体(*FAS1*遺伝子欠失)。シグナルは観られない。

(I) 花序分裂組織での*FAS1* mRNAの蓄積パターン。

(J) 花芽での*FAS1* mRNAの蓄積パターン。

Fig. 14 *FAS1*遺伝子の翻訳開始点近傍にあるプロモーター

各シスエレメントには翻訳開始点を+1とした位置からの距離(bp)を示している。

Fig. 15 *ΔFAS1/GUS*, *FAS2/GUS*のGUS染色パターン

(A, C, E, G) 3日目の芽生えの*pFAS1(1.3)/GUS*形質転換体のGUS染色。

(B, D, F, H) 3日目の芽生えの*pFAS2(3.6)/GUS*形質転換体のGUS染色。

(A, B) 芽生え全体。SAM, RAM, 側根原基でGUSによる染色が見られる。矢じりは、SAM, 側根原基, RAMでのGUSの発現を示している。

(C, D) 茎頂部の拡大。特にSAM, 葉原基でGUSによる染色が見られる。

(E, F) 側根原基部の拡大。

(G, H)根端部の拡大。RAMで染色が見られる。スケール 50 μm。

Fig. 16 培養細胞でのFAS遺伝子の発現解析

(A) シロイヌナズナ培養細胞(T87)の植え継ぎ後、内在性のFAS1, FAS2, histone H4そしてAtDRHI遺伝子の発現の変動をpoly A RNAゲルブロットにより解析した.

[³H]-チミジンのDNAへの取り込みを指標にDNA合成量を調べた.

FAS1, FAS2, histone H4およびAtDRHI遺伝子の発現量をグラフ化した. 縦軸はそれぞれ0日目の発現量を1とした相対発現量を, 横軸は植え継ぎ後の日数を示している.

(B) pFAS1(1.1)/GUSを形質導入した形質転換培養細胞BY-2をアフィディコリンで同調させた後, アフィディコリンを除去することで細胞周期を進行させた.

GUS mRNA, NPTII mRNA量は半定量的RT-PCR法により定量した.

グラフ横軸はアフィディコリン除去後の時間を示している, 縦軸は相対発現量を示している. 相対発現量はアフィディコリン除去後9時間目(分裂指数が最大値になる)の発現量を1とした. DNA合成は[³H]-チミジンのDNAへの取り込み量を, 分裂指数は乳酸オルセインによる染色核をもつ細胞の比率をそれぞれ指標にした.

fasciata 突然変異体

Allele	Isolate No.	Background	Mutagen	Source
fas1-1		Enkheim	EMS	Reinholz
fas1-2	NoM2-50-#103	Nossen	EMS	This study
fas1-3	NoM2-82-fasv	Nossen	EMS	This study
hot (ΔFAS1)	vTAAT26C51	Columbia	T-DNA	This study
fas2-1		Landsberg er	EMS	Leyser & Furner
fas2-2	NoM2-96-fasx	Nossen	EMS	This study
fas2-3	NoM2-23-fasw	Nossen	EMS	This study
fas3-1	NoM2-137-fasu	Nossen	EMS	This study
fasM	NoM2-108-fasM	Nossen	EMS	This study
fasy	NoM2-55-fasy	Nossen	EMS	This study
fasp	NoM2-195-#214	Nossen	EMS	This study
faskT69	KT69	Wassilewskija	T-DNA	石黒澄衛博士

Table 1

成熟胚のSAM

	L1の細胞数	SAMの大きさ
Enkheim	6.8細胞 (n = 4)	31.6μm (n = 4)
<i>fas1-1</i>	7.2細胞 (n = 5)	37.6μm (n = 5)

Table 2

根の伸長速度

	Enkheim	<i>fas1-1</i>	Nossen	<i>fas2-2</i>	<i>fas1-1;fas2-2</i>
伸長速度 (mm/day)	8.5±0.8 n = 13	4.3±1.4 n = 14	9.5±1.5 n = 11	3.6±0.9 n = 10	5.0±1.2 n = 15

Table 3

RAMの根冠から伸長・分化領域の境界までの距離

	Enkheim	<i>fas1-1</i>	Landsberg <i>er</i>	<i>fas2-1</i>
距離 (mm)	1.19±0.17 n = 36	0.99±0.24 n = 26	1.50±0.23 n = 23	0.75±0.14 n = 30

Table 4

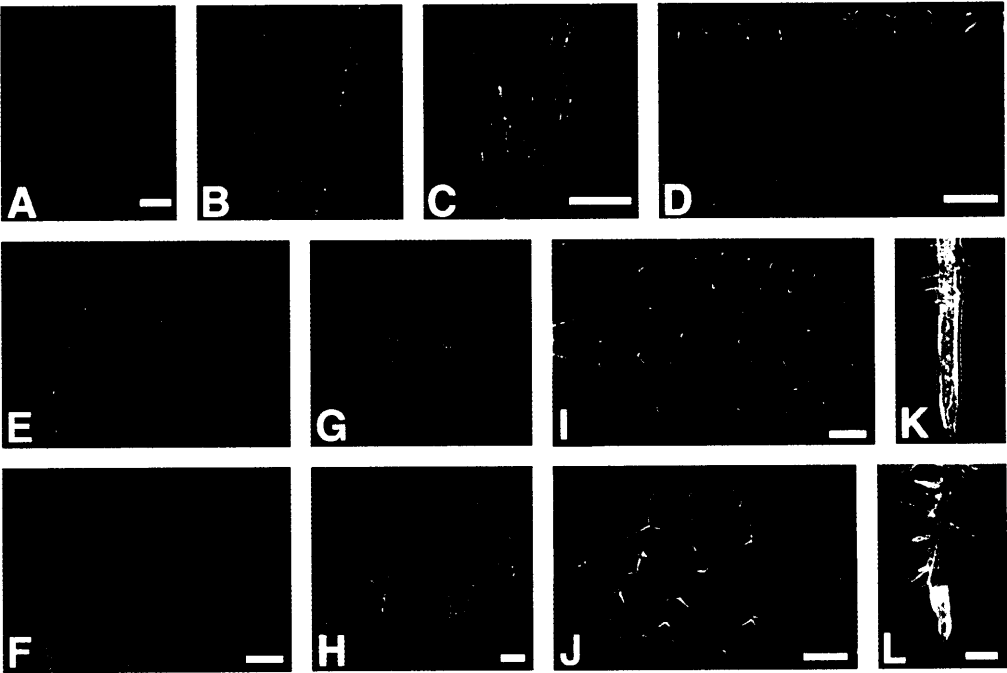


Figure 1

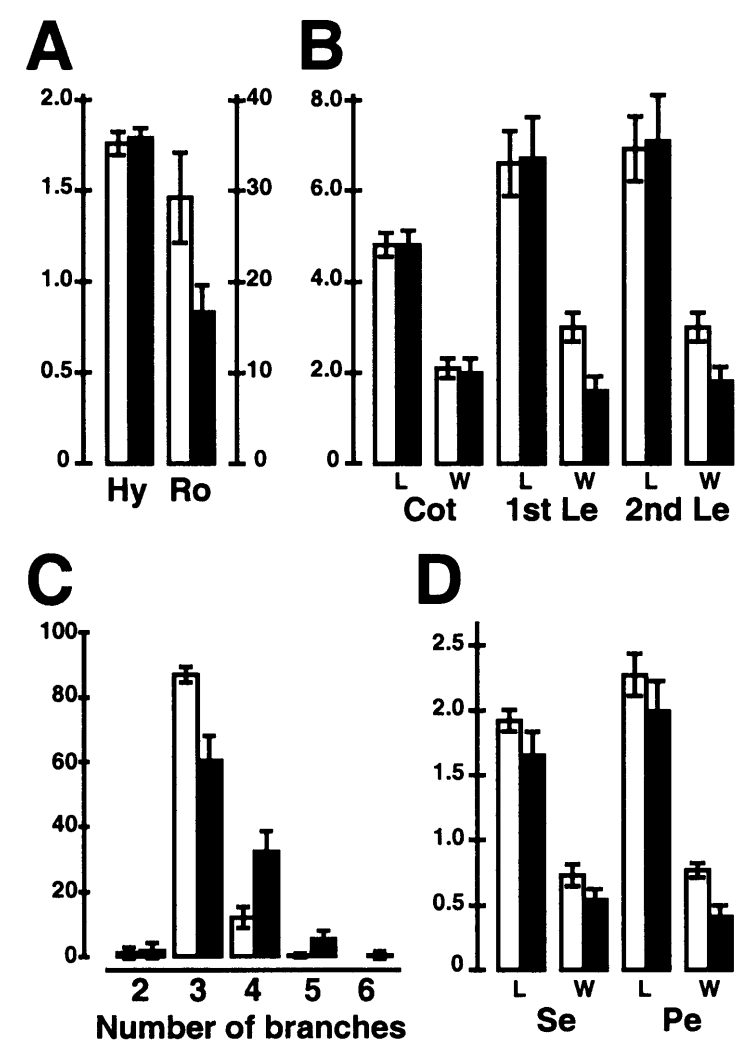


Figure 2

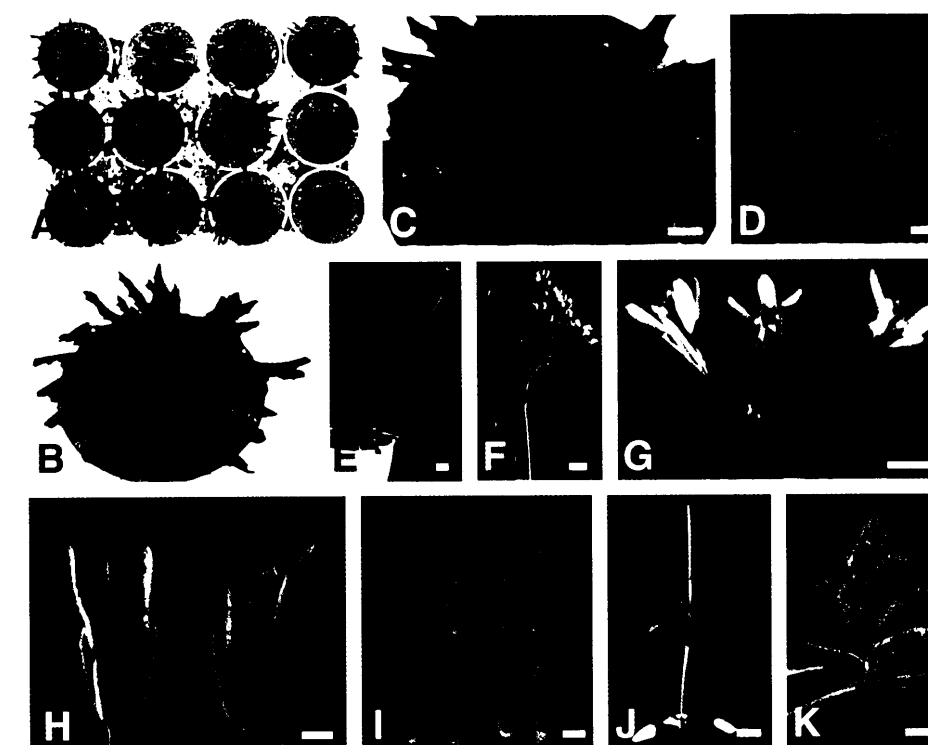


Figure 3

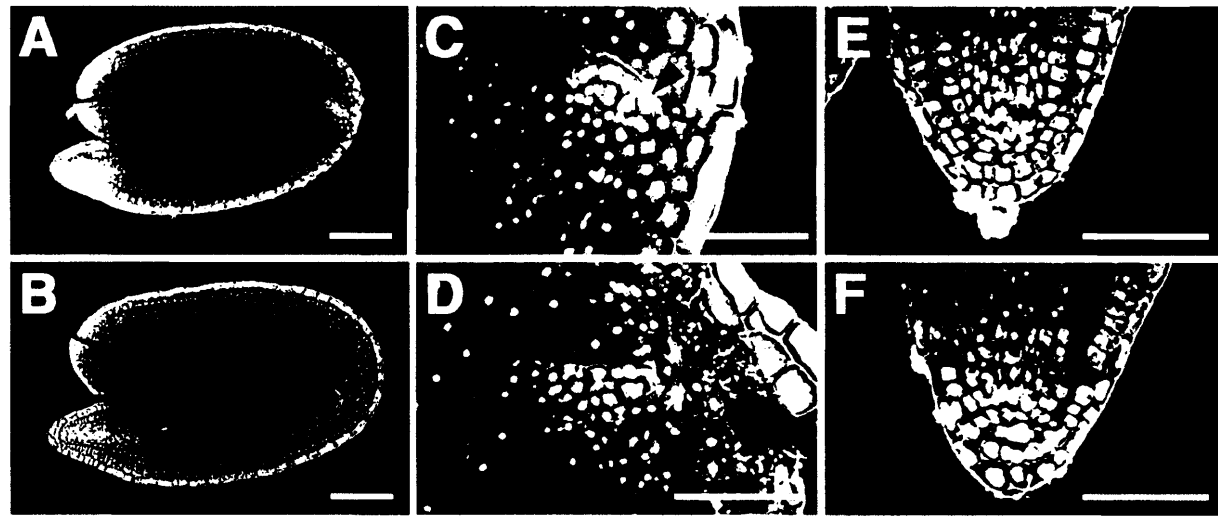


Figure 4

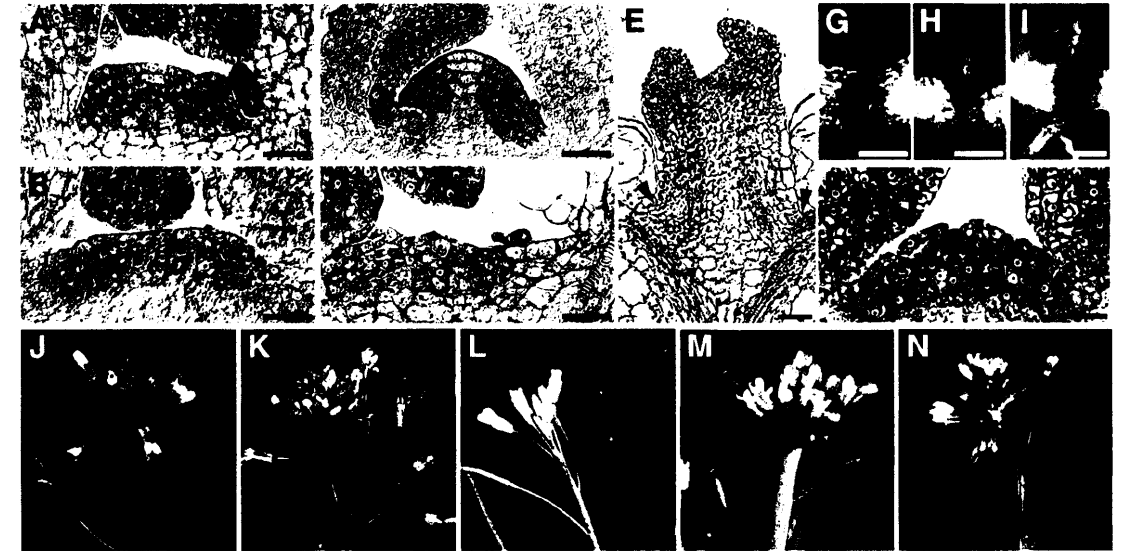


Figure 5

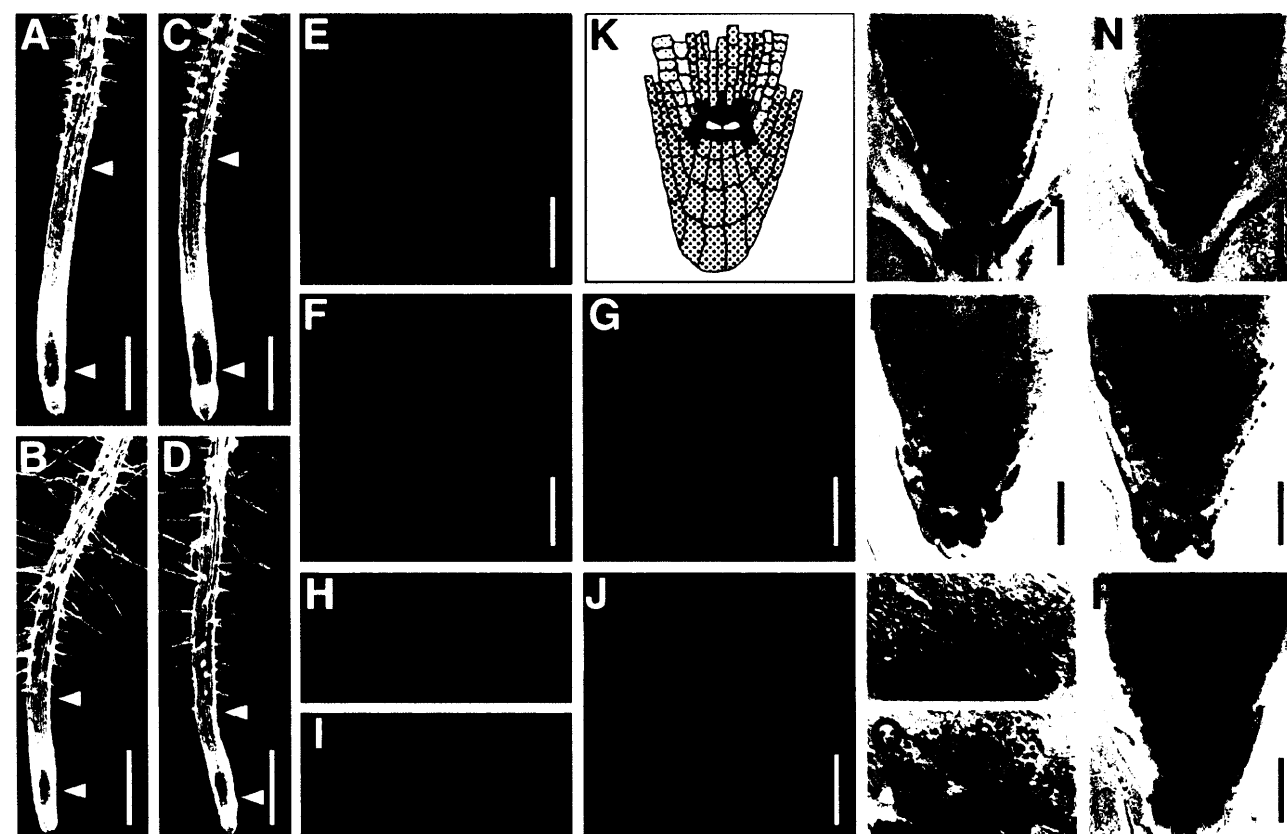


Figure 6

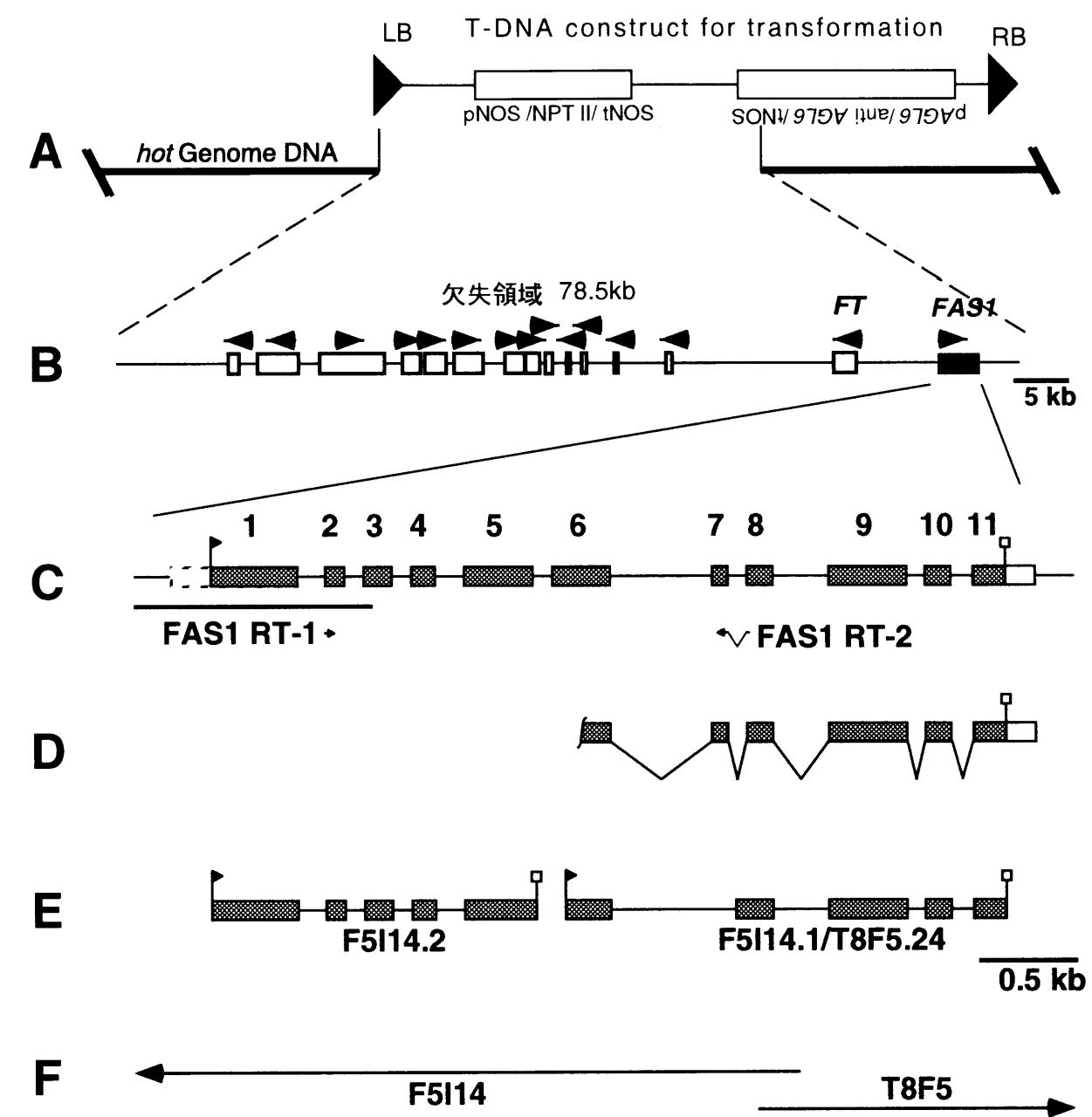


Figure 7

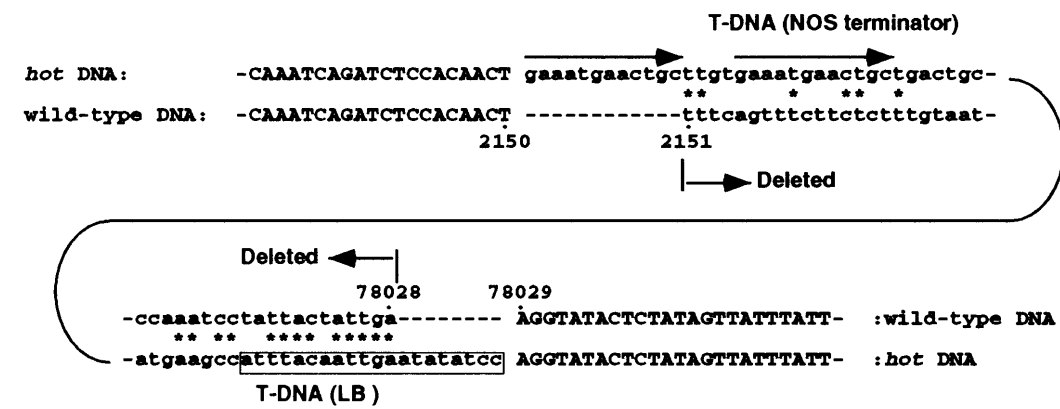


Figure 8

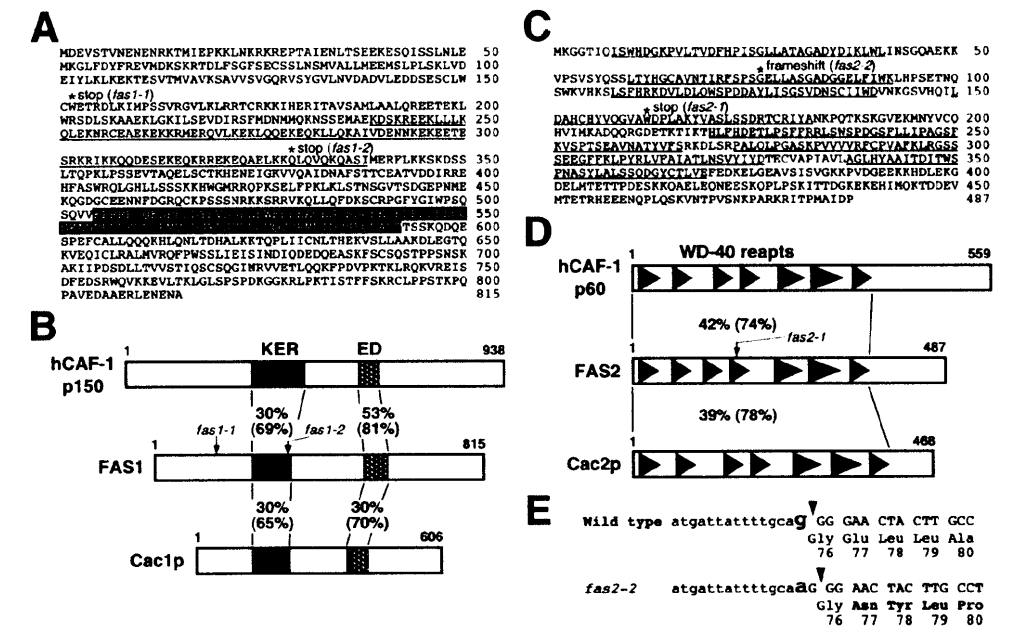


Figure 9

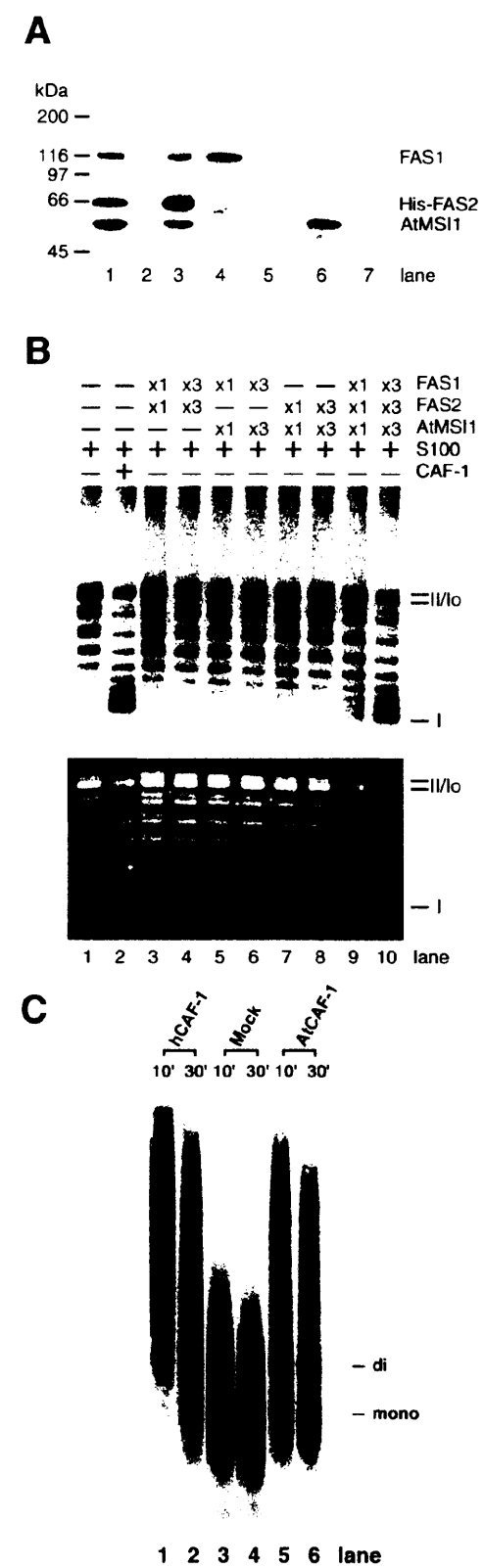


Figure 10

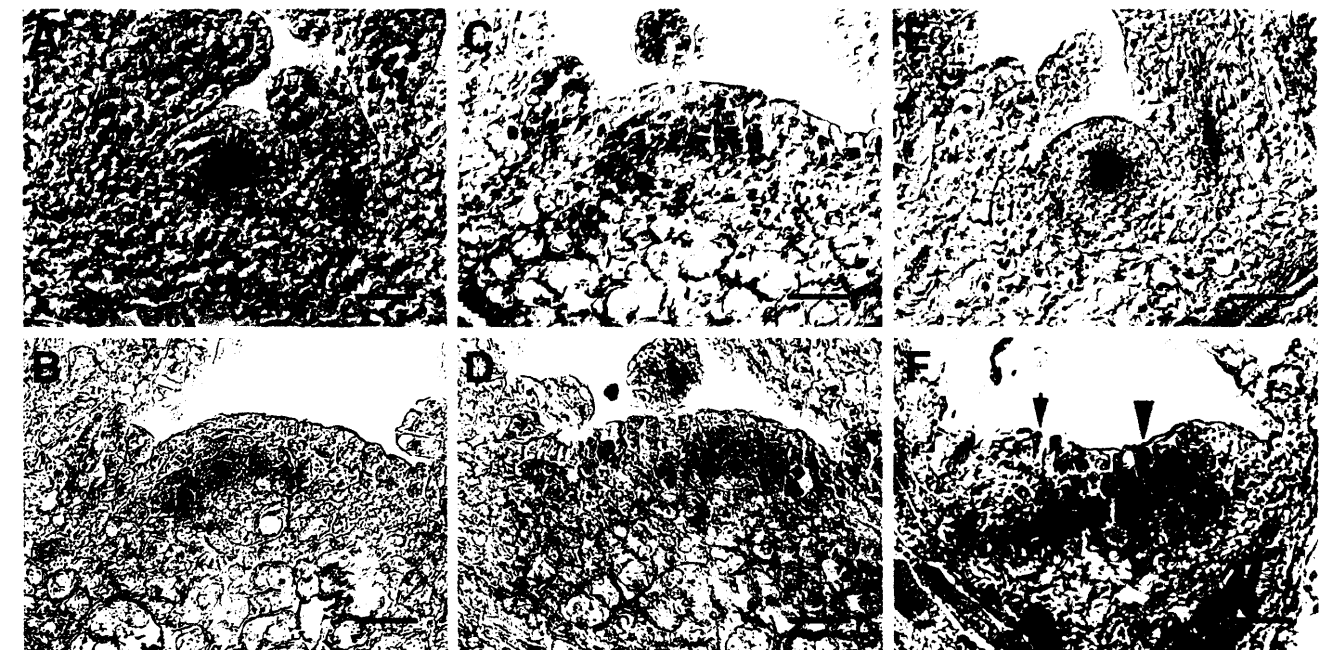


Figure 11

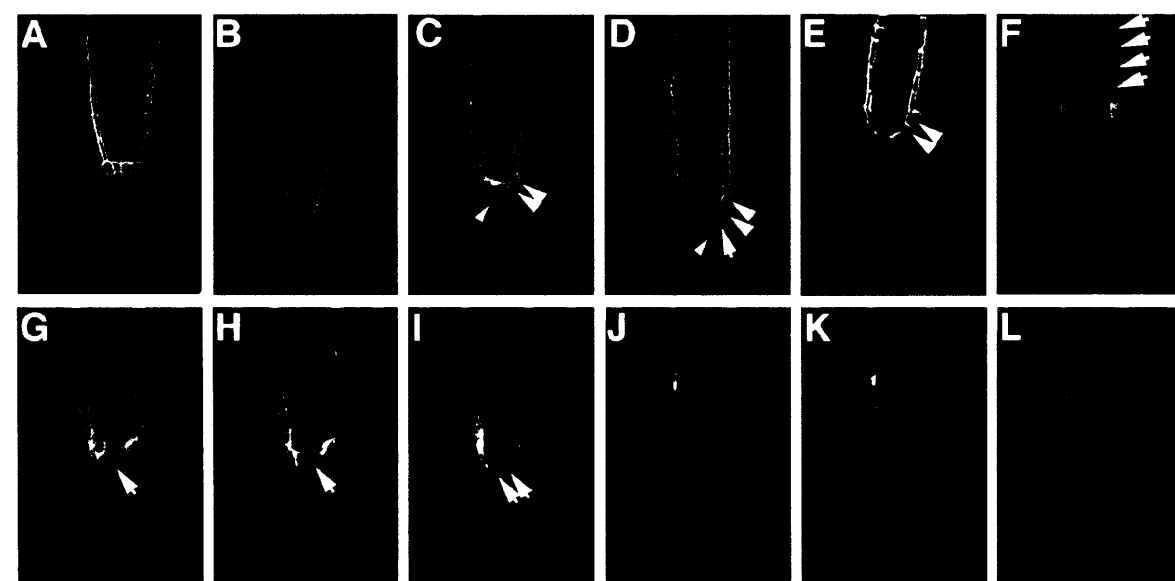


Figure 12

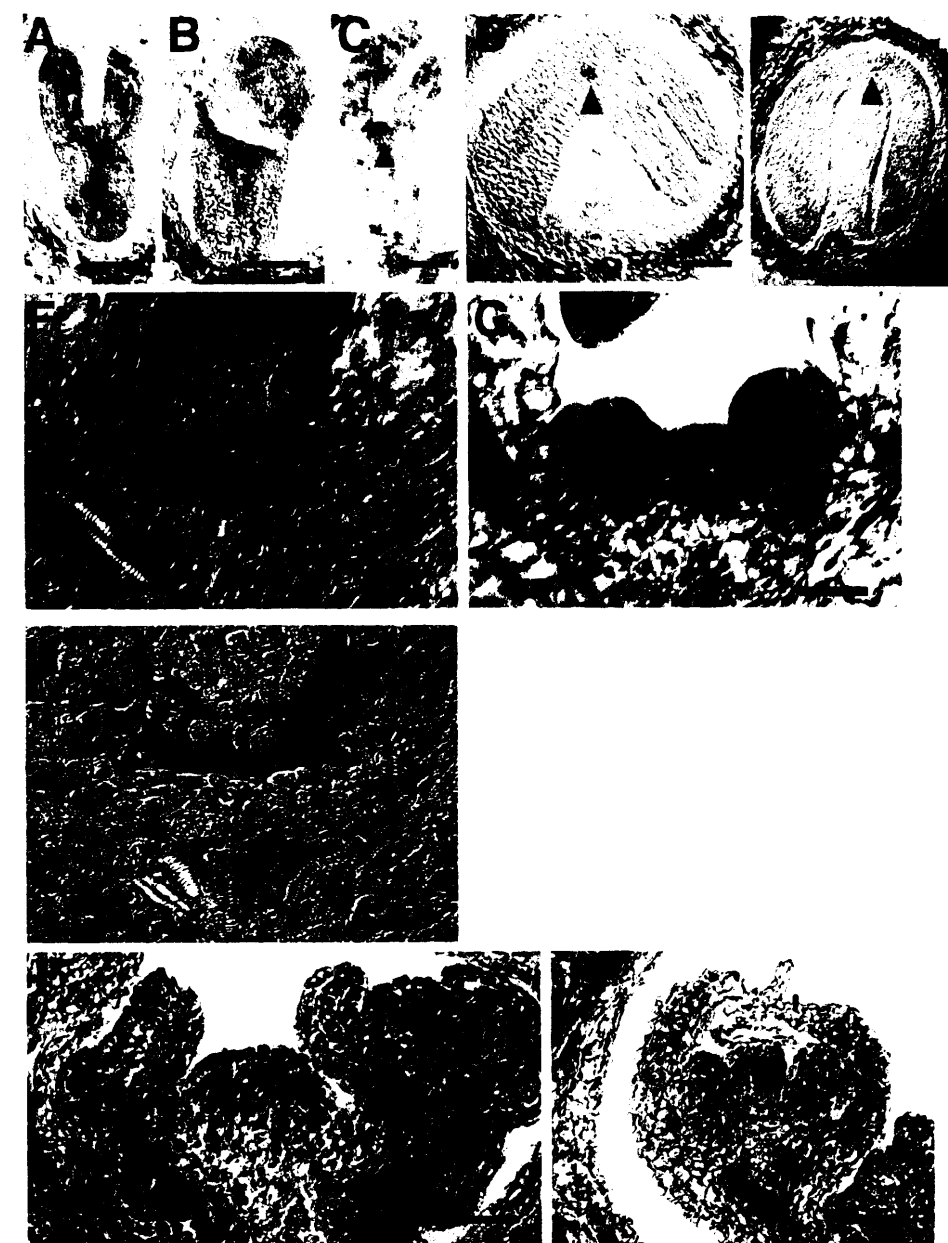
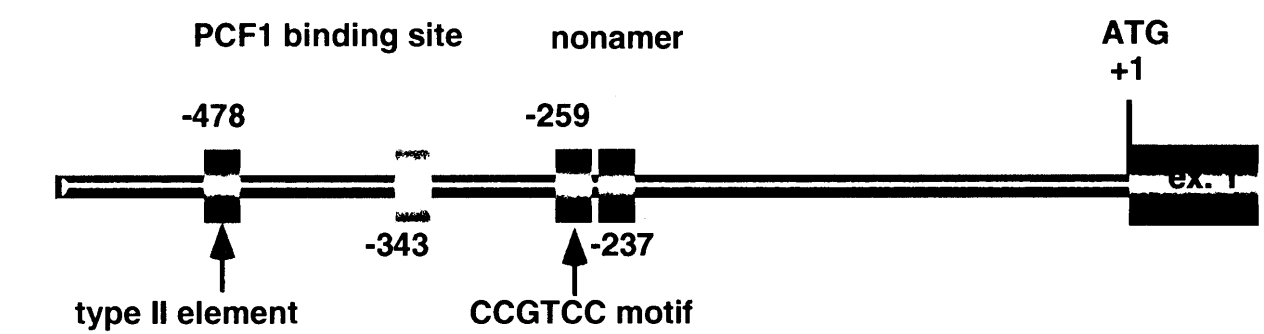


Figure 13



	Consensus	<i>FAS1</i> promoter	reference
type II element	GATCCGCG TGA	cATCCGCa TGA	Taoka <i>et al.</i> (1997)
PCF1 binding site	GGNCCCAC	GaGCCCAC	Kosugi and Ohashi (1997)
CCGTCC motif	CCGTCC	CCGTCa	Chaubet <i>et al.</i> (1996)
nonamer	CATCCAACG	aATC-AACG	Nakayama <i>et al.</i> (1992)

Figure 14

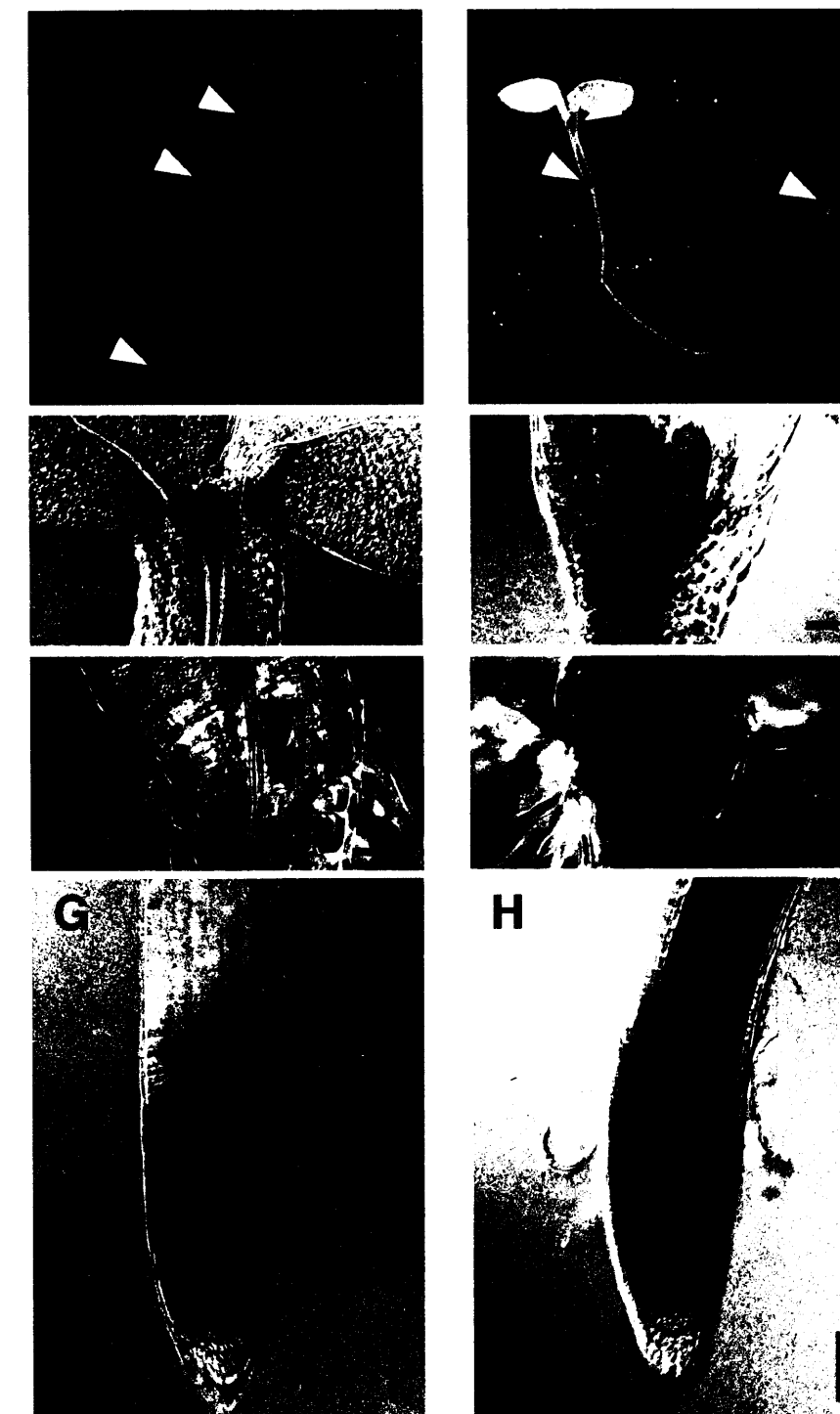
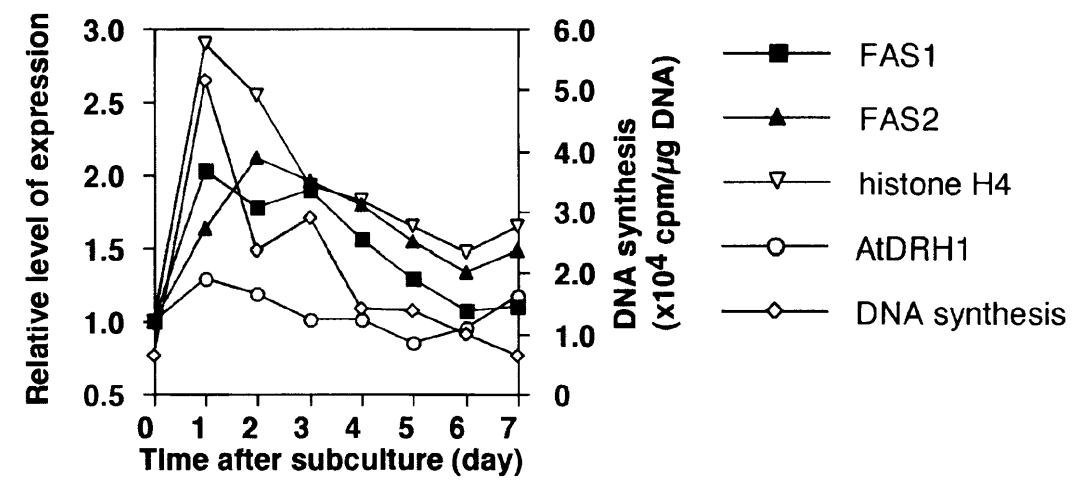
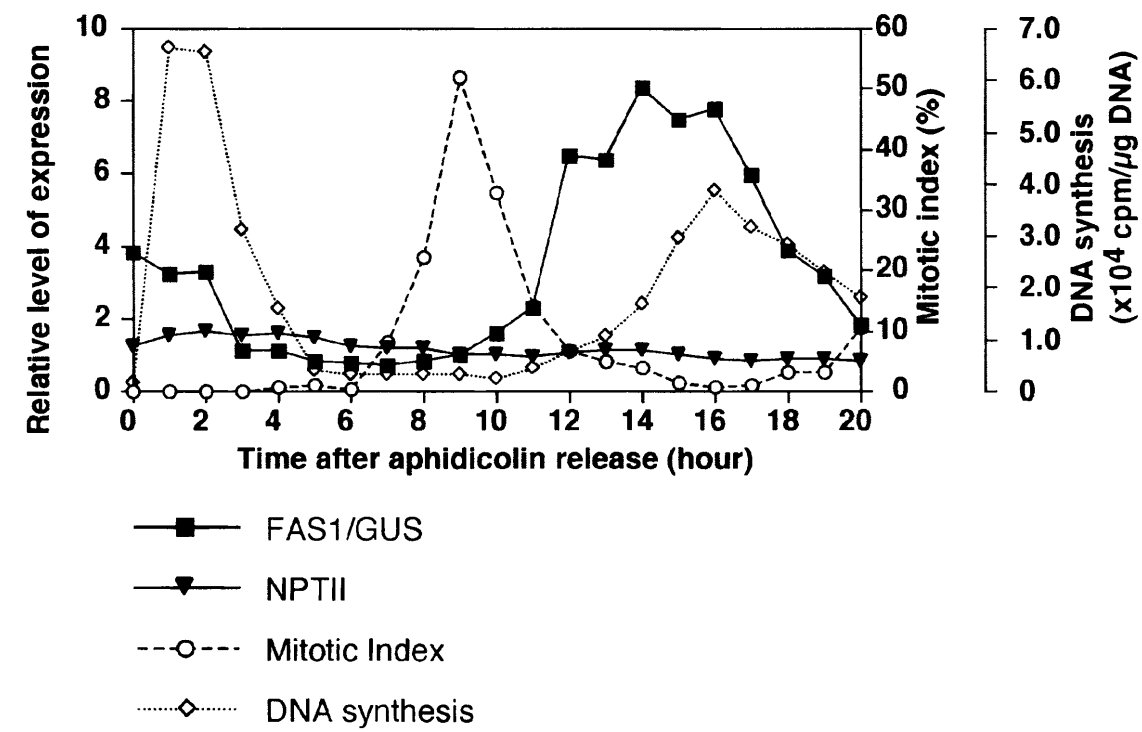


Figure 15

A**B****Figure 16**